

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut  
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
Lehrstuhl Bakteriologie  
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. R. Haas

Einfluss des Cag-Typ-IV-Sekretionssystems von  
*Helicobacter pylori* auf die Migration von Phagozyten

DISSERTATION  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Christine Woischke, geborene Weiss  
aus Ingolstadt  
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Wolfgang Fischer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Stefan Odenbreit

Prof. Dr. Gabriele Rieder

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2016

Teile dieser Arbeit wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

*Helicobacter pylori* interferes with leukocyte migration via the outer membrane protein HopQ and via CagA translocation.

Busch B, Weimer R, Woischke C, Fischer W, Haas R.

Int J Med Microbiol. 2015 May;305(3):355-64.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von PD Dr. W. Fischer und Prof. Dr. R. Haas im Zeitraum von Oktober 2009 bis Dezember 2014 angefertigt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1 MEDIZINGESCHICHTE UND ERREGERBESCHREIBUNG .....	7
2 CHARAKTERISIERUNG DES BAKTERIUMS <i>HELICOBACTER PYLORI</i> UND INFEKTIONSASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN .....	7
3 DIAGNOSTIK UND THERAPIE EINER <i>H. PYLORI</i> -INFEKTION .....	9
4 EIGENSCHAFTEN UND VIRULENZFAKTOREN .....	12
4.1 Urease .....	12
4.2 Motilität und Chemotaxis .....	12
4.3 Adhäsion .....	13
4.4 Bedeutende Faktoren für die Pathogenität von <i>H. pylori</i> .....	14
4.4.1 Das vakuolisierende Cytotoxin A (VacA) .....	15
4.4.2 Die cag-Pathogenitätsinsel und das Cytotoxin-assoziierte Gen (cagA) .....	16
4.4.3 Das cag-Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS) .....	18
4.4.4 CagA-Translokation über das Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS) .....	19
5 <i>H. PYLORI</i> -INFEKTION UND DIE DARAUS RESULTIERENDE IMMUNANTWORT .....	20
5.1 Immunmodulierende Strategien von <i>H. pylori</i> .....	21
6 ZIELSTELLUNGEN DIESER ARBEIT .....	23
<b>II MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
1 MATERIAL .....	25
1.1 Bakterienstämme .....	25
1.1.1 Escherichia coli-Stämme .....	25
1.1.2 Helicobacter pylori-Stämme .....	25
1.2 Zelllinien .....	26
1.3 Plasmide und Vektoren .....	26
1.4 Oligonukleotide .....	27
1.5 Antikörper .....	27
1.5.1 Primäre Antikörper .....	27
1.5.2 Sekundäre Antikörper .....	28
1.6 Enzyme und Proteine .....	28
1.7 Molekulargewichtsmarker .....	29
1.8 Medien, Platten und Zusätze .....	29
1.9 Antibiotika und Antimykotika .....	30
1.10 Puffer und Lösungen .....	31
1.11 Chemikalien .....	33
1.12 Hilfsmittel, Geräte und Apparaturen .....	34
1.12.1 Hilfsmittel .....	34
1.12.2 Geräte und Apparaturen .....	34
1.13 Kommerziell erworbene Kits .....	35
2 METHODEN .....	36
2.1 Bakterienkultur .....	36
2.2 Infektion von Zellen mit <i>H. pylori</i> .....	36
2.3 Arbeiten mit Zellkulturen .....	37
2.4 Neubauer Zählkammer .....	37
2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	38
2.6 Western-Blot .....	39
2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988) .....	40
2.8 DNA-Fragmentisolierung und -aufreinigung .....	41

2.9 Plasmid-DNA-Präparation .....	42
2.10 Analytische Plasmid-DNA-Präparation aus <i>E. coli</i> nach der Kochmethode .....	42
2.11 Präparation von chromosomaler <i>H. pylori</i> -DNA .....	42
2.12 Restriktionsenzymverdau .....	42
2.13 Zentrifugationsentsalzung .....	43
2.14 Ligation .....	43
2.15 Kontraselektionsmethode nach Dailidienne et al. 2006 (nach Etablierung durch Rohrer S., 2010) .....	44
2.16 Transformation von <i>E. coli</i> .....	45
2.16.1 Elektroporation von <i>E.coli</i> -Bakterien (Shigekawa und Dower, 1988) .....	45
2.17 Transformation von <i>H. pylori</i> .....	46
2.17.1 Transformation von <i>H. pylori</i> (Haas et al., 1993) .....	46
2.17.2 Elektroporation von <i>H.pylori</i> -Bakterien (Segal und Tompkins, 1993) .....	46
2.18 Ortsspezifische Mutagenese mit Hilfe des ExSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene®) .....	47
2.19 Granulozytennachweis durch Färbungen .....	47
2.19.1 Hämatoxylin/Eosin (HE) –Färbung .....	47
2.19.2 Giemsa Färbung .....	48
2.20 DNA-Sequenzierung .....	48
2.21 Zellisolation aus Vollblut .....	49
2.21.1 Zelltrennung der Dichte nach mittels Histopaque®-Gradienten (Sigma-Aldrich) .....	49
2.21.1.1 Granulozytenisolierung .....	49
2.21.1.2 Monozytenisolierung .....	51
2.22 Differenzierung von Monozyten in Dendritische Zellen .....	52
2.23 Fluorescence activated cell sorting (FACS) .....	52
2.23.1 Verwendung als Zellanalyseinstrument .....	52
2.23.2 Verwendung als Zellzählinstrument .....	54
2.24 Chemotaxis Assays .....	55
2.24.1 Boyden Chamber .....	57
2.24.2 Kollagengele .....	57
<b>III ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
1 UNTERSUCHUNG DER TRANSLOKATION UND DER PHOSPHORYLIERUNG VON CAGA IN MAGENEPITHELZELLEN UND LEUKOZYTEN .....	59
2 UNTERSUCHUNG DER PROZESSIERUNGSTELLE VON CAGA .....	63
2.2 Herstellung der Deletionsmutante P12CagAΔN6 .....	64
2.3 Untersuchungen zur Funktion der Prozessierungsstelle in Bezug auf die Translokation und Phosphorylierung des CagA-Proteins in Phagozytenzelllinien .....	69
2.4 Zeitliche Messungen im Rahmen von Translokations- und Phosphorylierungsexperimenten mit P12 und P12CagAΔN6 .....	74
3 ZELLMIGRATIONSEXPERIMENTE .....	76
3.1 Boyden Chamber-Experimente .....	76
3.1.1 Vortestungen zur Etablierung der experimentellen Bedingungen und Einführung in die Boyden-Chamber Technik .....	76
3.1.2 Boyden-Chamber-Experimente mit infizierten Zellen .....	80
3.2 Kollagengel-Experimente .....	86
<b>IV DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
1 DAS CAGA-EFFEKTORPROTEIN .....	91
2 VERGLEICH DER PROZESSIERUNGSMUTANTE P12CAGAAΔN6 MIT VERSCHIEDENEN <i>H. PYLORI</i> -STÄMMEN IN BEZUG AUF PROZESSIERUNG UND TYROSIN-PHOSPHORYLIERUNG .....	92
3 ZUSAMMENFASSUNG DER PROZESSIERUNGS- UND TYROSINPHOSPHORYLIERUNGS-EXPERIMENTE .....	94
4 DIE BEDEUTUNG VON CAGA-EFFEKTORPROTEIN UND TYP-IV-SEKRETIONSSYSTEM AUF IMMUNMODULIERENDE PROZESSE .....	95
5 CHEMOTAXIS .....	97

5.1 Vergleich der $\Delta$ PAI-Mutante mit dem P12-Wildtyp-Stamm in Boyden-Chamber-Migrationsexperimenten .....	100
5.2 Vergleich der $\Delta$ PAI-Mutante mit dem P12-Wildtyp-Stamm in Kollagengel-Migrationsexperimenten .....	101
6 EINORDNUNG DER FUNKTION DENDRITISCHER ZELLEN BEI EINER <i>H. PYLORI</i> -INFEKTION UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER AKTUELLEN LITERATUR .....	101
7 ZUSAMMENFASSUNG DER MIGRATIONSEXPERIMENTE .....	103
<b>V LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>105</b>
<b>VI ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>116</b>
<b>VIII DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>120</b>

# **I Einleitung**

## **1 Medizingeschichte und Erregerbeschreibung**

23 Jahre nach der Entdeckung des Bakteriums *Helicobacter pylori* in Biopsien der Magenschleimhaut von Patienten mit Gastritis wurden Barry Marshall und Robin Warren dafür 2005 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt. Ihnen gelang es, die gramnegativen, spiralförmigen Bakterien aus antralen Magenbiopsien zu kultivieren (Marshall und Warren, 1984). Galt der Magen, bedingt durch seinen niedrigen pH, vormals als steril (Solnick et al., 2001), musste die mikrobiologische und medizinische Fachwelt nunmehr umdenken, was die Pathogenese von Magengeschwüren und anderen gastralen Krankheiten wie beispielsweise des Magenkarzinoms angeht. Durch die Entdeckung von *H. pylori* verschoben sich die ätiopathologische Betrachtungsweise von einer durch Säureüberschuss bedingten Genese hin zu infektiologischen Überlegungen, verbunden mit der Möglichkeit zum Einsatz von Antibiotika (Prabhu et al., 2014).

## **2 Charakterisierung des Bakteriums *Helicobacter pylori* und infektionsassoziierte Erkrankungen**

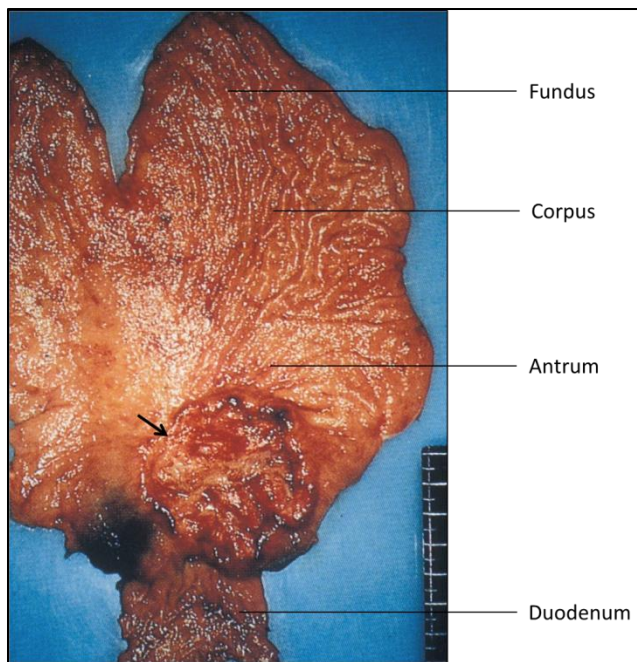
Die Kultivierung von *H. pylori*, einem gram-negativen, spiralförmigen- oder gebogenen Stäbchenbakterium mit unipolar angeordneten Flagellen ist, im Vergleich zu anderen Bakterienarten, anspruchsvoller. Es wächst in serum- oder blutsupplementierten Komplexmedien in mikroaeroben Milieu bei 37 °C. *H. pylori* ist als korrelierendes Pathogen und/oder Risikofaktor für die Typ-B-Gastritis (bakterielle Gastritis), die Ulcera ventriculi et duodeni, die Riesenfaltengastritis, das Adenokarzinom des Magens vom intestinalen Typ nach Laurén, sowie das primär extranodale Lymphom des Gastrointestinaltraktes (mucosa associated lymphoid tissue oder MALT-Lymphom) anerkannt (Blaser, 1997). Schauplatz der Gastritis ist die Magenschleimhaut (Tunica mucosa), bestehend aus dem die Magendrüsen überkleidenden Epithel und der darunter liegenden Lamina propria. Hier kommt in der Histologie ein Entzündungszellinfiltrat zur Darstellung. Die in der Tunica mucosa befindlichen Zellen charakterisieren das entzündliche Geschehen näher. Je nachdem, ob es sich um ein granulozytäres oder ein lymphoplasmazelluläres Infiltrat handelt, ist die Gastritis

als akut (aktiv) oder chronisch einzustufen. In den meisten Fällen ist die Entzündung der Magenschleimhaut jedoch eine chronisch-aktive.

Obwohl die Mehrzahl der Patienten keine Symptome aufweist, ist interessanterweise bei allen infizierten Patienten eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Magenschleimhautentzündung histologisch nachzuweisen (Dehesa et. al, 1991). Bei symptomatischen Patienten kann es im Rahmen der oben genannten Pathologien zu Halithosis, unspezifischen Oberbauchbeschwerden, auch „*Non-ulcer-Dyspepsia*“ genannt, sowie zu gefährlichen Erosionsblutungen kommen.

Die chronische Gastritis vom Typ B ist typischerweise im Antrum lokalisiert. Von dort ausgehend kann sie sich nach kranial ausbreiten, wodurch sich die Antrum-Korpusgrenze nach oben verschiebt. Es folgt eine Belegzellreduktion und konsekutiv nimmt die Säureproduktion ab. Der Endzustand einer sogenannten Hypo- oder Achlorhydrie begünstigt wiederum das Auftreten einer intestinalen Metaplasie, welche als fakultativ präkanzeröse Läsion gesehen werden kann (Friis-Hansen et al., 2006). Im Verlauf kann sich über das Stadium einer intestinalen Metaplasie ein Magenkarzinom vom intestinalen Typ nach Laurén entwickeln (Watari et al., 2014). Dieses tritt vorwiegend an der kleinen Kurvatur der Antrumregion im Magen auf und weist die Histologie eines Adenokarzinoms auf. Zehn Prozent der infizierten Individuen entwickeln ein Ulkusleiden, ein bis drei Prozent ein Magenkarzinom, und unter 0,1 Prozent erkranken im Laufe der Zeit an einem MALT-Lymphom (Hagymási et al., 2014; Peek et al., 2006).





**Abbildung 1: Makroskopische Aufnahme eines Magenkarzinoms**

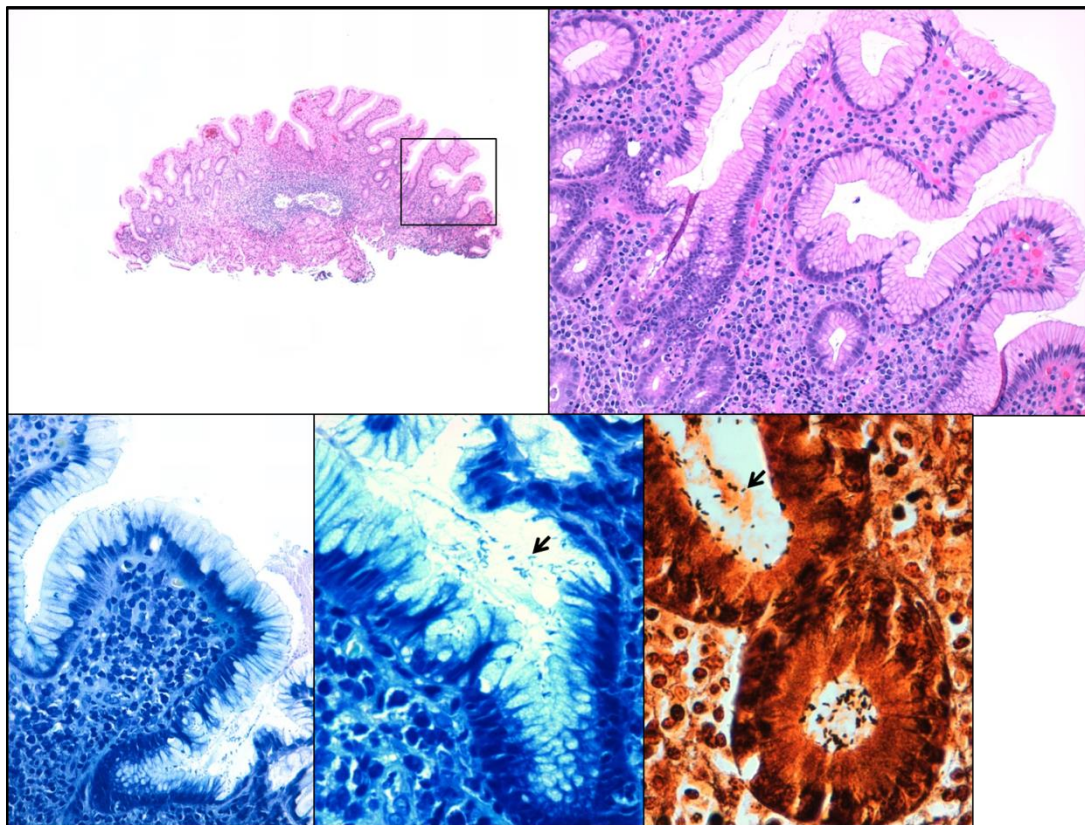
(aus dem Archiv des Pathologischen Institutes der LMU München, mit freundlicher Genehmigung von Prof. T. Kirchner) Gezeigt ist ein entlang der großen Kurvatur eröffnetes Gastrektomiepräparat mit einem kleinkurvaturseitig gelegenen ca. 5 cm durchmessenden Tumor (Pfeil) im Magenantrum und kleinem anhängenden Duodenalsegment.

### 3 Diagnostik und Therapie einer *H. pylori*-Infektion

Zum Nachweis einer *H. pylori*-Infektion bestehen diverse diagnostische Optionen, wobei grundsätzlich zwischen invasiven (mit Endoskopie) und nicht-invasiven Methoden (ohne Endoskopie) unterschieden wird.

Die für den Patienten risikoarme, nichtinvasive Diagnostik wird meist zur Therapiekontrolle oder für epidemiologische Studien verwendet. Im Rahmen des  $^{13}\text{C}$ -Atemtestes, wird nach oraler Gabe von  $^{13}\text{C}$ -markierten Harnstoff,  $^{13}\text{CO}_2$  in der Ausatemluft massenspektroskopisch gemessen. Die Umwandlung erfolgt durch die Urease des Bakteriums, wobei zu beachten ist, dass die Sensitivität dieses Tests unter einer säuresuppressiven Therapie vermindert ist. Ohne säuresuppressive Therapie beträgt die Sensitivität und Spezifität jedoch  $> 90\%$ , wie auch für den folgenden Test. Der *H. pylori*-Antigennachweis im Stuhl ist eine weitere Option in der nicht-invasiven Diagnostik. Eine weitere Methode besteht im Serum-Antikörpernachweis (mittels ELISA oder Western-Blot) (Lopes et al., 2014). Hierbei sollte jedoch beachtet werden, dass *H. pylori*-Antikörper auch nach erfolgreicher Eradikation persistieren können.

Im Rahmen einer Endoskopie werden aus dem Magenkorpus und -antrum Biopsien entnommen. Diese können im Urease-Schnelltest (*Helicobacter*-Urease-Test, HUT) auf die *H. pylori*-eigene Ureaseproduktion untersucht werden, welche via Farbstoffindikator sichtbar gemacht wird. Darüber hinaus erbringt die Pathologie den histologischen Keimnachweis durch Mikroskopie der mit verschiedenen Färbungen (Warthin-Starry, Giemsa, Hämatoxylin/Eosin) behandelten Gewebeproben, wobei sich neben Hämatoxylin/Eosin, die Giemsa-Färbung aufgrund ihrer einfachen Durchführung und Zuverlässigkeit im Alltag etabliert hat (Lee et al., 2015).



**Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahmen von *H. pylori*-positiven Magenbiopsien**

(aus dem Archiv des Pathologischen Institutes der LMU München mit freundlicher Genehmigung von Prof. T. Kirchner) Die obere Zeile zeigt zwei HE-gefärbte histologische Schnitte einer antralen Magenbiopsie (linke Seite: Übersicht in einer 0,4-fachen Vergrößerung; rechte Seite: Detailansicht in einer 20-fachen Vergrößerung). Gut erkennbar ist hierbei das dichte angedeutet bandförmige Entzündungszellinfiltrat bestehend aus Lymphozyten, Plasmazellen und neutrophilen Granulozyten. Die untere Zeile zeigt zwei Giemsa-gefärbte (linkes und mittleres Bild) histologische Schnitte und einen Warthin-Starry-gefärbten histologischen Schnitt derselben antralen Magenbiopsie (Linkes Bild dabei 40-fach, mittleres und rechtes Bild 63-fach vergrößert). Die beiden Giemsa-gefärbten Schnitte zeigen blau gefärbte *H. pylori*-Bakterien (Pfeil) mit fokaler Adhärenz an die Magenepithelzellen. Dieselbe Situation ist rechtsseitig in einer Warthin-Starry-Färbung dargestellt (Bakterien hier in schwarz, siehe Pfeil).

Zusätzlich besteht die Möglichkeit der kulturellen Anzucht von *H. pylori* mit dem großen Vorteil der antibiotischen Sensitivitäts- beziehungsweise Resistenztestung.

Molekularbiologische Methoden, wie der Nachweis durch PCR finden im klinischen Alltag kaum Verwendung.

Als Erstlinientherapie in Ländern ohne Clarithromycin-Resistenz über 20 % sollte innerhalb einer Eradikationstherapie eine Triple-Therapie bestehend aus einem Protonenpumpeninhibitor, Clarithromycin und entweder Amoxicillin oder Metronidazol über sieben Tage zur oralen Anwendung kommen. Ist für das Land allerdings eine Clarithromycin-Resistenz-Rate von über 20 % bekannt, sollte stattdessen eine Vierfach-Therapie mittels Bismutsalz, Protonenpumpeninhibitor, Tetracyclin und Metronidazol verwendet werden (Alahdab et. al, 2014). Bei Patienten mit Ulcuskrankheit konnten unter beiden „first-line“-Therapien die gleichen Eradikationsraten erzielt werden (Venerito et al, 2013). Eine prospektive multizentrische Studie mit über 1600 Patienten zeigte eine primäre Clarithromycin-Resistenz von 6,7 % in Deutschland (Wüppenhorst et al., 2014).

In unseren Breiten beträgt die *H. pylori*-Eradikationsquote bei der oben genannten Tripletherapie > 90 %. Reinfektionen sind in wenigen Fällen (ca. 1% pro Jahr) möglich.

Von der European Helicobacter Study Group (EHSG) werden diverse Schemata vorgeschlagen, davon sind zwei der am häufigsten angewandten in der nachfolgenden Tabelle zu sehen. Im Falle einer erfolglosen Eradikationstherapie (Kontrolle des Eradikationserfolges ca. 6-8 Wochen nach Therapie) sollte eine Resistenztestung im Speziallabor folgen.

**Tabelle 1: Therapieschemata zur Behandlung einer *H. pylori*-Infektion**

<b>„Französische Therapie“</b>	<b>„Italienische Therapie“</b>
Protonenpumpeninhibitor (= PPI), wie zum Beispiel Pantoprazol oder Omeprazol	PPI
Clarithromycin (2 x 500 mg/d)	Clarithromycin (2 x 500 mg/d)
Amoxicillin (2 x 1000 mg/d)	Metronidazol (2 x 400 mg/d)

## 4 Eigenschaften und Virulenzfaktoren

*H. pylori* verfügt über eine Vielzahl von spezifischen Faktoren und Mechanismen, um den menschlichen Magen zu besiedeln und zu schädigen. Vor seiner Entdeckung wurde die Ursache von Magenbeschwerden eher auf psychologischer und psychosomatischer Ebene gesucht. Eine infektiöse Genese der Symptome wurde nicht in Betracht gezogen, galt doch der Magen mit seinen unwirtlichen Verhältnissen, beispielsweise seinem niedrigen pH-Wert und seiner starken Peristaltik, als steril.

### 4.1 Urease

Um sich vor dem im Magen vorherrschenden sauren pH-Wert von 1 bis 1,5 zu schützen und so die Magenschleimhaut kolonisieren zu können, bedarf es eines Enzyms namens Urease (Stingl und De Reuse, 2005). Dieses aus zwei wesentlichen Untereinheiten, UreA und UreB, bestehende bakterielle Enzym (Labigne et al., 1991) wird für die Spaltung von Harnstoff in Ammoniak und Hydrogencarbonat benötigt und ist als essentieller Faktor für die Kolonisierung des Magens anzusehen (Eaton et al., 1991). Eine wichtige Rolle spielt hierbei das UreI-Protein. Dieses fungiert als pH-abhängiger Harnstoffkanal, sodass in saurem Milieu Harnstoff schneller in das Bakterium aufgenommen und dort metabolisiert werden kann (Scott et al., 2000). Im Zytoplasma und eventuell Periplasma des Bakteriums wird durch die Protonierung des Ammoniaks ein neutraler pH-Wert aufrechterhalten (Marshall et al., 1990). Infolgedessen ist es *H. pylori* möglich, der Säure im Magenlumen eine Zeit lang zu trotzen um in die bicarbonatgepufferte Schleimschicht über der Magenmukosa, seine eigentliche ökologische Nische, zu gelangen (Stingl et al., 2002; Scott et al., 1998). Dort angelangt hat die Urease jedoch noch eine weitere Funktion. Durch die Produktion von Ammoniak gelingt es *H. pylori*, Verbindungen zwischen den Zellen, sogenannte *tight junctions*, zu trennen (Lytton et al., 2005), was am ehesten auf eine Urease-vermittelte Aktivierung der „myosin light chain-Kinase“ zurück zu führen ist (Fedwick et al., 2005; Wroblewski et al., 2009).

### 4.2 Motilität und Chemotaxis

Mit Hilfe eines *in vivo*-Infektionsmodells in Mongolischen Wüstenrennmäusen (Mongolian gerbils) konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* im sauren Magenlumen (pH 2-3) in weniger als einer Minute irreversibel unbeweglich wird. Dies wurde auf die hohe Pepsinaktivität bei

niedrigem pH-Wert zurückgeführt und lässt darauf schließen, dass dem Bakterium nur eine äußerst kurze Zeitspanne bleibt, um die schützende Schleimhautschicht (pH 6-7) zu erreichen (Schreiber *et al.*, 2005). Um dies zu bewerkstelligen, ist eine schnelle Orientierung und effiziente Motilität in Richtung der Mukosa notwendig. *H. pylori* bewegt sich durch seine helikale Form sowie zwei bis sieben unipolare Flagellen, welche aus den Komponenten FlaA und FlaB bestehen (Suerbaum *et al.*, 1993). Die beiden Komponenten wiederum sind von einer membranartigen Hülle umzogen, die sie vor der schädigenden Magensäure schützt (Geis *et al.*, 1993). Die Kolonisation wird jedoch nicht allein durch die Beweglichkeit, sondern vielmehr durch ein erfolgreiches Zusammenspiel von Bewegung und Orientierung gewährleistet. Der pH-Gradient mit einer Variation von pH 1 (Lumen) bis pH 7 (Mucus über der Epithelschicht) dient *H. pylori* dabei zur chemotaktischen Orientierung (Yoshiyama *et al.*, 1999; Schreiber *et al.*, 2004) in Richtung Magenschleimhaut.

#### 4.3 Adhäsion

Für ein Bakterium, dessen ökologische Nische der Magen, ein Organ mit ausgeprägter Peristaltik und ständiger Mukuserneuerung ist, stellt die Adhäsion an Epithelzellen einen weiteren Faktor von enormer Wichtigkeit für die Kolonisation dar. Somit ist die Adhäsion der erste wichtige Schritt im Rahmen einer Infektion. Darüber hinaus wird ein bedeutungsvoller Virulenzfaktor, das Cytotoxin-assoziierte Antigen, durch das Typ-4-Sekretionssystem von *H. pylori* direkt in die Zelle injiziert. Auch hierfür ist die Adhäsion an die Zielzellen eine unabdingbare Voraussetzung. Adhäsion verhindert oder verlangsamt somit den Abtransport Richtung Duodenum und vermittelt den Kontakt, der zur Virulenzfaktor-Injektion nötig ist. Rund 20% der Bakterien sind an Epithelzellen gebunden, während der weitaus größere Rest sich frei im Mucus befindet (Schreiber *et al.*, 2004). Die Adhäsion geschieht mit Hilfe von äußeren Membranproteinen (*outer membrane proteins*, OMPs) der Hop-Familie (*Helicobacter outer membrane proteins*) (Odenbreit *et al.*, 2009). Weitere für die Adhäsion an Magenepithelzellen wichtige Faktoren scheinen sog. CEACAMs darzustellen (Königer V. und Haas R., persönliche Mitteilung). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Protein der Hop-Familie, HopQ, nicht nur eine Rolle bei der Adhäsion spielt, sondern auch einen Einfluss auf die CagA-Translokation hat (Belogolova *et al.*, 2013). BabA (*blood group antigen-binding adhesin*) ist ein wichtiger Vertreter unter den Adhäsionsproteinen von *H. pylori*, welches an das Blutgruppenantigen Lewis<sup>b</sup> auf der Oberfläche menschlicher Zellen, bindet (Borén *et al.*, 1993; Ilver *et al.*, 1998). Das Lewis<sup>b</sup>-Antigen findet sich auf Epithelzellen mit

positivem Sekretorstatus, welche das Antigen also in die Schleimschicht sekretieren können (Evans und Evans, 2000), sowie auf dem Muzin MUC5AC, welches in der Mukusschicht des Magens anzutreffen ist (Ho et al., 2004; Lindén et al., 2002; Van den Brink et al., 2000). Darüber hinaus gibt es ein weiteres wichtiges Adhäsion, SabA (Sialinsäure-bindendes Adhäsion A), welches an die sialylierten Blutgruppenantigene Sialyl-Lewis<sup>x</sup> und Sialyl-Lewis<sup>a</sup> bindet. Diese Blutgruppenantigene werden durch *H. pylori* Cytotoxin-assoziiertes Gen (*cag*)-*Pathogenitätsinsel* (PAI) abhängige Hochregulation der  $\beta$ 3GnT5-Glykosyltransferase (Marcos et al., 2008) verstärkt auf der Oberfläche von inflammatorisch geschädigtem Magenepithel produziert und verdrängen die natürlich vorkommenden Lewis-Antigene (Mahdavi et al., 2002). Andere äußere Membranproteine, wie zum Beispiel AlpA, AlpB (Adhärenz-assoziierte Lipoproteine A und B) und HopZ, sind mitbeteiligt an der Adhäsion, obwohl noch nicht geklärt ist, an welche Rezeptoren sie binden (Oderbreit 2005; Odenbreit et al., 1999; Peck et al., 1999). Ein anderes Membranprotein, OipA, ist zwar auch an der Adhärenz beteiligt, jedoch nicht als einer der Hauptfaktoren (Yamaoka et al., 2002). Die Bindung von OipA an Epithelzellen führt aber, wie es scheint, zu entscheidenden Veränderungen. So werden daraufhin Signalkaskaden aktiviert, welche eine wichtige Rolle in der Interleukin (IL-) 6- und 8-Induktion spielen (Yamaoka et al., 2004; Lu et al., 2005). Dies könnte dazu beitragen die chronische Entzündungsreaktion im Gewebe aufrechtzuerhalten. Mittlerweile weiß man, dass solche chronischen Inflammationsgeschehen die Entstehung von Karzinomen begünstigen (Coussens et al., 2002, Ohnishi et al., 2013). Tatsächlich korrelieren Infektionen mit OipA-positiven Stämmen positiv mit der Prävalenz von Magenkarzinomen und Duodenalulcera (Yamaoka et al., 2006).

#### **4.4 Bedeutende Faktoren für die Pathogenität von *H. pylori***

Nicht alle *H. pylori*-Stämme sind im gleichen Maße schädigend für den Organismus. So sind beispielsweise einige Faktoren bekannt, welche mit schwerwiegenderem Krankheitsgeschehen oder rascherem Voranschreiten der Erkrankungen assoziiert sind. Unter diesen Faktoren sind vor allem das vakuolisierende Zytotoxin VacA, das Produkt des *cytotoxin-associated gene A* (*cagA*) und das bereits erwähnte OipA-Protein zu nennen. *H. pylori*-Stämme, die im Besitz des *cagA*-Gens sind und ein aktives VacA-Protein besitzen, sogenannte Typ I Stämme, sind im Gegensatz zu *cagA*-negativen und VacA-minderaktiven (Typ II) Stämmen mit schwereren Krankheitsverläufen assoziiert (Xiang et al., 1995). Die Anwesenheit von CagA und OipA ist dabei mit der Entwicklung einer atrophischen Gastritis

und somit von Magenkarzinomen korreliert (Franco et al., 2008; Rieder et al., 2005; Ogura et al. 2000). Hingegen konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass Infektionen mit VacA-aktiven Stämmen eher mit der Entstehung von Ulcera assoziiert sind (Fujikawa et al., 2003; Telford et al., 1994). Jedoch ist es nicht nur die Ausstattung von *H. pylori* mit Virulenzfaktoren, welche das Risiko einer Erkrankung bestimmt. Auch das Immunsystem des Wirts spielt eine Rolle, wenn es darum geht, welche Folgen die Infektion für den Menschen haben wird. So konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen im Gen des Zytokins Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) die Entstehung einer atrophischen Gastritis durch eine vergleichsweise hohe, *H. pylori*-getriggerte, IL-1 $\beta$ -Produktion begünstigen können (El-Omar et al., 2000). Im weiteren Abschnitt sollen die einzelnen, für die Pathogenität von *H. pylori* bedeutenden, Faktoren genauer beschrieben werden.

#### **4.4.1 Das vakuolisierende Cytotoxin A (VacA)**

Das vakuolisierende Cytotoxin A (VacA) ist einer der am längsten bekannten Virulenzfaktoren von *H. pylori* (Cover und Blaser, 1992; Leunk et al., 1988). Es wird als Protoxin mit einer Länge von 140 kDa produziert, und durch einen Autotransporter-Mechanismus sekretiert (Fischer et. al., 2001a). Dabei wird das Protoxin in ein reifes, 88 kDa großes Toxin prozessiert, welches entweder in Kontakt mit der Bakterienzelloberfläche bleibt (Ilver et al., 2004) oder in die Umwelt abgegeben wird (Cover und Blaser, 1992; Schmitt und Haas, 1994). Das reife, sekretierte VacA-Toxin kann weiter proteolytisch in ein 55 kDa (p55)- und ein 33 kDa (p33)-Fragment aufgespalten werden. Diese haben unterschiedliche Funktionen: So hat das kürzere N-terminale Fragment die Fähigkeit, Kanäle in Zellmembranen sowie Vakuolen zu bilden. Das längere C-terminale Fragment wiederum ist für die Oligomerisierung des Toxins und die Rezeptorerkennung und -bindung verantwortlich (Reyrat et al., 1999). Im Gegensatz zu manchen anderen bakteriellen AB-Toxinen sind die beiden Fragmente des VacA-Toxins jedoch nicht unabhängig voneinander. Die Sequenz des *vacA*-Gens und somit die Aktivität des VacA-Proteins kann unterschiedlich ausfallen. Die Variationen innerhalb des VacA-Proteins kommen in der N-terminalen Signalsequenz (s1 und s2), der Mittelregion des p55-Fragments (m1 und m2) und in der Intermediärregion (i1 und i2) vor (Atherton et al., 1995; Rhead et al., 2007). Je nach Kombination der verschiedenen Allele, gehen Genotypen mit einem größeren oder kleineren Krankheitsrisiko daraus hervor. So ist das Vorkommen von Ulcera vor allem mit den VacA-Allelen s1 und i1 vergesellschaftet (Basso et al., 2008). Es sind einige Rezeptoren für VacA bekannt. So bindet

es an Epithelzellen durch die Rezeptor-Tyrosinphosphatasen RPTP $\alpha$  und RPTP $\beta$  (Yahiro et al., 1999; Yahiro et al., 2003), wohingegen auf T-Lymphozyten die CD18-Untereinheit von  $\beta$ 2-Integrinen als Rezeptor dient (Sewald et al., 2008). Nach erfolgter Rezeptorbindung sind die Effekte des VacA-Toxins auf die Zielzellen vielfältig. *In vitro* verursacht VacA die Ausbildung zytoplasmatischer Vakuolen in Epithelzellen (Cover et al., 1992), was in einem auffälligen Phänotyp resultiert und zu seiner frühen Entdeckung führte. Dieses Phänomen lässt sich vermutlich auf die anionenselektive Kanalaktivität des VacA-Proteins in späten Endosomen zurückführen (Genisset et al., 2007). Des Weiteren hemmt VacA den Vesikeltransport zu den Lysosomen (Montecucco et al., 1996; Satin et al., 1997), und hohe Mengen an VacA können durch Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien Apoptose induzieren (Galmiche et al., 2000; Willhite und Blake 2004). Einen weiteren wichtigen Einfluss hat VacA auf das menschliche Immunsystem, indem es die Antigenpräsentation in B-Zellen behindert (Molinari et al., 1998). Darüber hinaus zeichnet das VacA-Toxin verantwortlich für eine herabgesetzte IL-2 Expression von T-Lymphozyten, und somit für eine herabgesetzte T-Zell-Aktivierung (Boncristiano et al., 2003; Gebert et al., 2003; Sundrud et al., 2004).

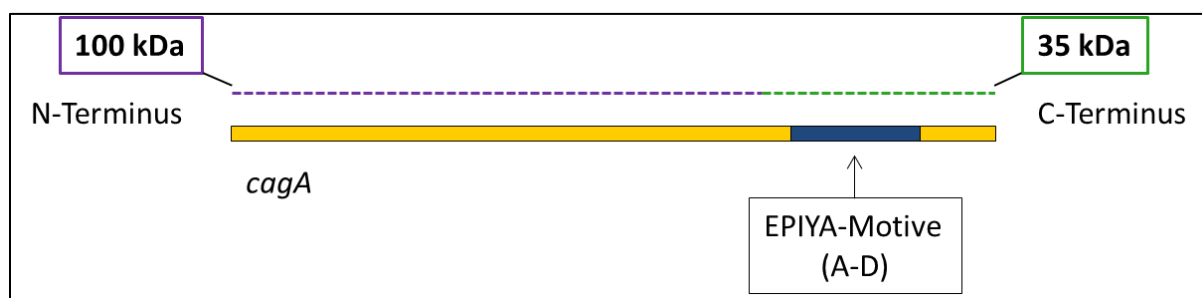
#### **4.4.2 Die *cag*-Pathogenitätsinsel und das Cytotoxin-assoziierte Gen (*cagA*)**

Schon früh zeigte sich, dass *H. pylori*-Stämme mit einer hohen vakuolisierenden Aktivität, meist im Besitz des *cagA*-Gens sind (Tummuru et al., 1993). Dieses wurde daher Cytotoxin-assoziiertes Gen A (*cagA*) genannt (Covacci et al., 1993). Dass das hierauf kodierte CagA-Protein ein bedeutender Virulenzfaktor ist, verdeutlicht die Erkenntnis, dass *cagA*-positive Stämme, sogenannte Typ I-Stämme, mit folgenschwereren Krankheitsverläufen assoziiert sind als *cagA*-negative Stämme (Typ II) (Kuipers et al., 1995). Das *cagA*-Gen liegt innerhalb einer Pathogenitätsinsel (PAI), welche aus diesem Grund *cag*-PAI genannt wurde. Schon 1990 etablierten Hacker et al. den Begriff **pathogenicity island** (PAI) für große mobile Regionen im Genom von uropathogenen *E. coli*-Bakterien, die Gene für mehrere Virulenzfaktoren enthielten (Hacker et al., 1990). Mittlerweile kennen wir zahlreiche Bakteriengattungen, wie zum Beispiel *Yersinia* oder *Salmonella*, die solch eine Pathogenitätsinsel besitzen (Schubert et al. 2004; Figueira et al., 2012). Die darauf enthaltenen Gene kodieren meist für Proteine oder Enzyme, die den Erreger entweder infektiöser machen oder ihm eine verstärkte Virulenz verleihen. Innerhalb solcher PAI können auch Sekretionssysteme kodiert sein (Shea et al., 1996). Die 37 kb große *cag*-PAI von



*H. pylori* liegt zwischen repetitiven 31 bp langen DNA-Abschnitten und enthält etwa 28 Gene (Censini et al., 1996, Matteo et al., 2007), welche unter anderem für das CagA-Protein und ein Typ IV-Sekretionssystem (T4SS) kodieren. Letzteres ist in der Lage, CagA ins Zytoplasma von Zielzellen zu translozieren (Asahi et al., 2000; Backert et al., 2000; Odenbreit et al., 2000; 2001; Stein et al., 2000). Die *cagPAI* hat einen, im Vergleich zum restlichen Genom, unterschiedlichen GC-Anteil, was darauf hinweisen könnte, dass sie durch horizontalen Gentransfer aufgenommen wurde (Hacker et al., 1997; Tomb et al., 1997). Die Funktion der einzelnen Gene innerhalb der *cagPAI* konnte durch systematische Mutagenese aufgeklärt werden. So kodieren 17 der 28 Gene für Proteine, welche für die Translokation des CagA-Effektorproteins in Epithelzellen unerlässlich sind. Zusätzlich spielen 14 dieser Gene eine große Rolle bei der IL-8-Induktion in Zielzellen (Fischer et al., 2001).

Bis dato ist das auf der *cagPAI* kodierte CagA-Protein das einzige bekannte Effektorprotein des *cag*-T4SS. Es ist ca. 128-145 kDa groß, wobei die Größenvariabilität des Proteins auf die Duplikation interner Gensequenzen in verschiedenen *H. pylori*-Stämmen zurückzuführen ist (Covacci et al., 1993). Es wird via Typ-IV-Sekretion in Epithelzellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen transloziert (Odenbreit et al., 2000; Backert et al., 2000). In Phagozyten wird es anschließend in ein 100 kDa- und ein 40 kDa-Fragment prozessiert, wobei letzteres an den sogenannten EPIYA (nach den Aminosäuren Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala benannt)-Motiven A bis D phosphoryliert wird (Odenbreit et al., 2001). Diese befinden sich im C-terminalen Bereich des CagA-Proteins und zumeist enthält der jeweilige *H. pylori*-Stamm mehrere EPIYA-Motive (Higashi et al., 2005; Naito et al., 2006). In der AGS (Magenepithel)-Zelllinie findet diese Prozessierung nicht statt, was bedeuten könnte, dass die Phagozytosefähigkeit eine wichtige Rolle bei der Prozessierung des CagA-Proteins spielt, oder sogar einen alternativen Translokationsmechanismus bedingen könnte.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des *cagA*-Gens**

Die Darstellung beinhaltet in blau eingezeichnet die EPIYA-Motiven und die durch gestrichelte Linien (grün und lila) angedeuteten Prozessierungsfragmente.

Betrachtet man den Vorgang der Pyosphorylierung genauer, so wird dieser nach Translokation des Proteins durch Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie bewerkstelligt (Backert et al., 2001; Selbach et al., 2002; Püls et al., 2002; Stein et al., 2002). Daraus resultiert die Dephosphorylierung mehrerer Proteine, beispielsweise Cortactin, Ezrin und Vinculin, innerhalb der Wirtszelle (Odenbreit et al., 2000; Selbach et al., 2002, 2003 und 2004; Moese et al., 2007). Tyrosin-phosphoryliertes CagA interagiert mit der Tyrosin-Phosphatase SHP-2 (Higashi et al., 2002) mit dem Resultat, dass „*focal adhesion kinases*“ (FAK) inaktiviert werden (Tsutsumi et al., 2006) und somit der charakteristische, als *hummingbird* bezeichnete Phänotyp mit seinen langen Zellausläufern entsteht (Segal et al., 1999; Backert et al., 2001). Des Weiteren werden auch sogenannte *tight junctions*, das sind Kontakte zwischen den einzelnen Epithelzellen, durch CagA gestört (Amieva et al., 2003) was eventuell dazu führen könnte, dass Bakterien auch in tiefere Gewebeschichten gelangen könnten. Auch geht die apikal-basolaterale Zellpolarität und somit die Barrierefunktion der Magenmukosa durch Inhibition der Kinase Par-1, welche die Zellpolarität reguliert, verloren (Saadat et al., 2007). Es ist darüber hinaus bekannt, dass *cagPAI*- positive Stämme mit einer ausgeprägteren proinflammatorischen Reaktion (IL-8-Induktion) einhergehen (Sánchez-Zauco et al., 2014). Mit Hilfe von Mutationsanalysen konnte festgestellt werden, dass hierfür zwar mehrere *cagPAI*-Gene, nicht jedoch das *cagA*-Gen notwendig sind (Crabtree et al., 1995; Sharma et al., 1995; Segal et al., 1997). Die Daten von Fischer et al. deuten darauf hin, dass die proinflammatorische Antwort am ehesten durch einen intakten Sekretionsapparat hervorgerufen wird (Fischer et al., 2001). Daneben wird die Hochregulation weiterer Chemokine wie zum Beispiel, GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) (Beales und Calam, 1997), ENA-78 (epithelial neutrophil activating peptide 78) (Bliss, Jr. et al., 1998) und TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor alpha) (Klausz et al., 2003) durch direkten Kontakt von *H. pylori* und Zielzelle (Rieder et al., 1997) induziert. Transloziertes CagA stimuliert, unabhängig von seiner Phosphorylierung, in der Zielzelle den Ras/Raf/Mek/ERK-Signalweg, durch Interaktion mit dem Adaptorprotein Grb2 (Mimuro et al., 2002).

#### 4.4.3 Das *cag*-Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS)

Sekretionssysteme stellen allgemein bakterielle Virulenzfaktoren dar. Ihre Funktion ist es, schädigende Proteine über die Bakterienmembran hinaus in den Extrazellulärraum, oder direkt in eine Zielzelle hinein zu translozieren. Unter Gram-negativen Bakterien sind derzeit sechs Sekretionssysteme genauer charakterisiert (Desvaux et al., 2009, Filloux et al., 2013).

Verschiedene Proteine des auf der *cag*-PAI kodierten Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS) zeigen deutliche Sequenzähnlichkeiten zu dem VirB/D4-T4SS von *Agrobacterium tumefaciens* (Covacci et al., 1999; Buhrdorf et al., 2003). Das VirB/D4-System ist ein lange bekanntes und gut erforschtes T4SS, und gilt als Prototyp für T4SS. *Agrobacterium tumefaciens* gelingt es mit diesem System, einzelsträngige T-DNA über die Bakterienmembran in Pflanzenzellen zu translozieren, wo sie Mutationen im Genom verursacht und somit zur Ausbildung von Tumoren führt (Llosa et al., 2000; Zupan et al., 2000). Jedoch findet sich nicht für jedes Gen des *cag*-T4SS ein entsprechendes Analogon im VirB/D4-System (Kutter et al., 2008). Grundsätzlich lassen sich die einzelnen Proteine des *cag*-T4SS-Apparates bezüglich ihrer Funktion in CagA-Translokationsfaktoren, Apparatsproteine, und Proteine mit unterstützender Funktion unterscheiden. Daneben gibt es Proteine mit derzeit noch unbekannter Funktion (Fischer et al., 2001). Ein weiteres Typ-IV-Sekretionssystem von *H. pylori* ist das ComB-T4SS, welches die natürliche Kompetenz des Bakteriums, bezüglich der DNA-Aufnahme vermittelt (Hofreuter et al., 1998 und 2001).

#### **4.4.4 CagA-Translokation über das Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS)**

CagA ist bisher das einzige bekannte Effektorprotein, welches über das *cag*-T4SS in die Wirtszellen eingeschleust wird. Die Translokation beginnt mit dem Herstellen eines Kontaktes zwischen dem *cag*-T4SS und der Oberfläche der Wirtszelle. Hierzu binden vermutlich die Proteine CagI, CagL und CagY an  $\beta 1$ -Integrine (Kwok et al., 2007; Jimenez-Soto et al., 2009). Integrine sind glycosylierte Transmembranproteine, welche im Magen jedoch nicht an der apikalen, dem Lumen zugewandten Seite der Zellen, sondern vielmehr auf der basolateralen Seite vorkommen. Dies wirft die Frage auf, wie *H. pylori* den Integrinkontakt herstellt, ist das Bakterium doch in der apikalen Mukusschicht zu finden. Eine der Überlegungen hierzu verweist auf die Möglichkeit, dass geringe Mengen an Integrinprotein auch an der apikalen Seite der Zelle zu finden sein könnte (Zuk und Matlin 1996), und dass der größte Teil der CagA-Translokation erst nach dem Auflösen von Zell-Zell-Kontakten stattfindet. Denkbar wäre auch, dass *cag*-PAI-unabhängige Faktoren via Signalkaskaden eine Integrin-Translokation an den apikalen Zellpol auslösen könnten (Kwok et al., 2007; Wessler und Backert, 2008). Trotz dieser Hypothesen bleibt der Vorgang bisher nicht eindeutig geklärt. Bekannt ist jedoch, dass die Interaktion des *cag*-T4SS mit  $\beta 1$ -Integrinen eine starke proinflammatorische Reaktion, via IL-8-Induktion auslöst (Odenbreit et al. 2002), welche polymorphonukleäre Zellen zum Ort des Geschehens lockt. Hier kommt es

infolgedessen zur Entzündungsreaktion im Gewebe (Sharma et al., 1995; Segal et al., 1997), wobei die IL-8-Induktion CagA-unabhängig ist (Fischer et al., 2001). Neutrophile Granulozyten stellen die größte Gruppe der polymorphonukleären Leukozyten dar. Sie sind durch ihre Fähigkeit zur Migration und Phagozytose gekennzeichnet. Innerhalb der angeborenen zellulären Immunität erreichen sie als erste infizierte Regionen, insbesondere wenn es sich um die Abwehr von Bakterien handelt (Amulic et al., 2012).

## **5 *H. pylori*-Infektion und die daraus resultierende Immunantwort**

Die meist in der Kindheit erworbene Infektion mit *H. pylori* führt zu einer verstärkten Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie zum Beispiel Interleukin-8, aus Epithelzellen (Atherton et al., 2009). In Folge dessen kommt es zur Infiltration der Magenschleimhaut mit neutrophilen Granulozyten, Makrophagen sowie proinflammatorischen T-Helfer-Zellen, unter anderem Th1 und Th17-Zellen (Peek et al., 1995; Bamford et al., 1998). Einer der wichtigsten Regulatoren dieser inflammatorischen Antwort wird durch eine Untergruppe der CD4-positiven T-Zellen, die sogenannten regulatorischen T-Zellen, dargestellt, welche bei *H. pylori* cagPAI-positiven Patienten verstärkt zu finden sind (Robinson et al., 2008). Regulatorische T-Zellen unterdrücken die unspezifische und spezifische Immunantwort, schwächen die T-Helfer-Zell-Aktivität und verhindern somit eine überschießende Immunantwort (Lundgren et al., 2005; Rad et al., 2006). Im Jahr 2014 wurde gezeigt, dass regulatorische T-Zellen in Magenbiopsien *H. pylori*-positiver Patienten größtenteils CCR6 positiv sind, was ihnen ermöglicht auf eine cagT4SS-hervorgerufene CCL20-Expression zu reagieren. Dies mag, in Anbetracht der Tatsache, dass cagPAI-positive Stämme mit einem erhöhten Ulcusrisiko assoziiert sind, paradox erscheinen (Cook et al., 2014). Eine mögliche Theorie dazu ist, dass es durch ein Ungleichgewicht zwischen Inflammation und Kontrolle der Inflammation durch regulatorische T-Zellen zur Ulkulentstehung kommt (Cook et al., 2014). Eine indirekte Interaktion zwischen *H. pylori* und den immunkompetenten Zellen des Wirtsorganismus durch eine proinflammatorische Chemokinantwort ist jedoch nicht die einzige Schnittstelle, wenn es um das Zusammenspiel von Bakterium und Immunsystem geht. Es konnte gezeigt werden, dass es durch *H. pylori*-induzierte Auslösung von Zell-Zell-Kontakten auch zu einem direkten Kontakt zwischen Bakterium und Immunzellen kommen kann. Des Weiteren wurden elektronenmikroskopische Beobachtungen beschrieben, in denen dendritische Zellen intraepithelial zu finden sind und

mittels elongierten Zellausläufern in direkten Kontakt mit *H. pylori* und seinen Virulenzfaktoren gelangen (Necchi et al., 2009). Darüber hinaus spielen dendritische Zellen eine Schlüsselrolle im Rahmen der *H. pylori*-assoziierten Immunantwort, vor allem bei der Induktion der T-Zell-Antwort. So treiben dendritische Zellen, neben der proinflammatorischen T-Helfer-Zell-Antwort, die oben beschriebene Aktivierung regulatorischer T-Zellen voran und wahren so eine gewisse Homöostase zwischen Inflammation und Toleranz (Khamri et al., 2010; Shiu et al., 2013), wobei auch Beobachtungen hin zu einer stärkeren T-regulatorischen im Vergleich zur proinflammatorischen Antwort gemacht worden sind, was wiederum eine mögliche Erklärung der insuffizienten Bakterienlemination darstellen könnte (Kao et al., 2010). Die dendritischen Zellen sind vor dem Kontakt mit *H. pylori* noch nicht maturiert. Der Maturations- oder Aktivierungsprozess findet erst im Rahmen der Interaktion mit *H. pylori* statt (Kranzer et al., 2004, Hafsi et al., 2004). Im Jahr 2014 wurden Untersuchungen veröffentlicht welche zeigen, dass (*cagA*-positive) *H.pylori*-Stämme durch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 zu einer sogenannten Semimaturation der dendritischen Zellen führen. Semimature dendritische Zellen induzierten in diesen Experimenten eine Verschiebung der T-Zell-Aktivierung hin zu einer regulatorischen Antwort (Kaebisch et al., 2014).

### **5.1 Immunmodulierende Strategien von *H. pylori***

Trotz der massiven Entzündungsreaktion mit konsekutiver Abwehrzellmobilisation gelingt es immunkompetenten Individuen nicht, *H. pylori* zu eliminieren. Ohne antibiotische Mehrfachtherapie persistiert *H. pylori* jahrzehnte-, möglicherweise lebenslang im Wirt. Es stellt sich somit die Frage nach immunmodulierenden Strategien seitens der Bakterien (Fischer et al., 2009). Urease verhilft dem Bakterium dazu, den sauren pH-Wert des Magens für die Zeit zu tolerieren, die es benötigt, um in die mukusbedeckte Schicht über den Epithelzellen zu gelangen (siehe Kapitel 4.1). Diese Schicht enthält antimikrobielle Substanzen wie  $\beta$ -Defensin-1 und Cathelicidin LL-37 (Frye et al., 2000; Hase et al., 2003), welche bei Präsenz der *cag*-Pathogenitätsinsel verstärkt gebildet werden. Was auf den ersten Blick paradox wirkt, könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass sich *H. pylori* so einen Selektionsvorteil verschafft, indem es Konkurrenzbakterien ausschaltet (Hornsby et al., 2008). *H. pylori* scheint die Wirkung dieser antimikrobiellen Substanzen durch bestimmte, noch unbekannte Faktoren, umgehen zu können. Ein weiterer Punkt, der zur Modulation des

Immunsystems beiträgt, ist die Tatsache, dass *H. pylori*-LPS (Lipopolysaccharid) eine Lipid A-Variante enthält, welche 1000 Mal weniger stimulierend auf das menschliche Immunsystem wirkt als die anderer gastrointestinaler Mikroorganismen (Muotiala et al., 1992), unter anderem da es nicht durch TLR4 (Toll-like receptor), welcher im menschlichen Magen vorkommt, erkannt wird (Smith et al., 2003; Yokota et al., 2007). Durch einige charakteristische Lipid A-Strukturveränderungen ist es äußerst resistent gegenüber der antimikrobiellen Substanz Polymyxin (Tran et al., 2006). Eine weitere Besonderheit des *H. pylori*-LPS ist, dass es Lewis-Blutgruppenantigene enthält. *H. pylori* gleicht sich somit dem Wirt an, was als *molekulares Mimikry* bezeichnet wird. Das eigene Immunsystem richtet sich bei gesunden Menschen nicht gegen sich selbst, sodass *H. pylori* dadurch effektiver im menschlichen Magen persistieren kann (Appelmek et al., 2000). Auch *H. pylori*-Flagellin wird durch TLR5 so gut wie nicht erkannt (Lee et al., 2003; Galkin et al., 2008). DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule grabbing non-integrin) ist ein Rezeptor auf dendritischen Zellen, welcher Viren, Parasiten, Pilze und Bakterien, unter anderem *H. pylori* bindet (Koppel et al., 2005). Ist ein *H. pylori*-Stamm Lewis Antigen positiv ( $Le^+$ ), so kann er an den DC-SIGN-Rezeptor binden und induziert via IL-10-Induktion eine Th2-Immunantwort. Hingegen können  $Le^-$  *H. pylori*-Stämme diese Bindung vermeiden und induzieren somit stattdessen eine starke Th1-Immunantwort (Bergman et al., 2004). Ob ein *H. pylori*-Stamm  $Le^+$  oder  $Le^-$  ist hängt von der Aktivität von Fucosyltransferasen ab. Eine weitere wichtige immunmodulierende Funktion kommt dem VacA-Protein zu. Beta-2-Integrin, das CD 18-Oberflächenprotein auf T-Zellen, wurde als Rezeptor für VacA identifiziert. VacA kann so in T-Zellen aufgenommen werden und mit dem Zellzyklus interferieren, woraufhin die T-Zell-Proliferation gehemmt wird (Sewald et al. 2008).

In vielen Experimenten wurden bereits die Interaktionen des CagA-Proteins mit der Epithelzelle und die daraus resultierenden molekularen Wechselwirkungen charakterisiert. Jedoch ist über den Einfluss des *cag*-T4SS auf immunologische Zellen wenig bekannt. Bekannt ist jedoch eine Aggregation von Makrophagen unter dem Einfluss von *cag*-T4SS, durch eine T4SS-abhängige Induktion eines Adhäsionsmoleküls, genannt Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), welches sich alsdann vermehrt auf der Oberfläche von Makrophagen findet (Moese et al, 2002). Dies impliziert eine gewisse Migrationshemmung von Phagozyten. Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben gibt es direkten Kontakt zwischen dendritischen Zellen und *H. pylori*. Generell können Leukozyten im Rahmen zweier mechanistisch unterschiedlicher Arten migrieren. So stellt das vaskuläre Epithel eine

zweidimensionale Oberfläche dar auf der Leukozyten via Integrin-vermitteltem Kontakt zwischen Oberflächenproteinen der Immunzellen und endothelialen Oberflächenmolekülen (beispielsweise ICAM-1) migrieren. Im Gegensatz dazu wird die Migration in dreidimensionalem Gewebe (beispielsweise der Magenmucosa und -submucosa) durch Actomyosinkontraktion und möglicherweise durch Zellmembranausläufer bewerkstelligt (Lämmermann und Sixt, 2009).

## **6 Zielstellungen dieser Arbeit**

Die Translokation von CagA in Epithelzellen ist bereits bekannt und gut charakterisiert. Wie oben bereits beschrieben, wird CagA via T4SS in die Zielzelle injiziert (Asahi et al., 2000; Backert et al., 2000; Odenbreit et al., 2000 und 2001; Stein et al., 2000). Neben Epithelzellen wird CagA auch in Phagozyten transloziert, wo ebenfalls eine Phosphorylierung, jedoch zusätzlich eine proteolytische Prozessierung des ca. 135 kDa großen Volllängenproteins, in ein ca. 100 kDa großes N-terminales Fragment und ein ca. 35-40 kDa großes C-terminales Fragment, stattfindet. Das C-terminale Fragment wird im Bereich der EPIYA-Motive in der Zielzelle Tyrosinphosphoryliert, was wiederum viele verschiedene Zellfunktionen, wie beispielsweise die Zell-Zell-Kontakte, beeinflusst (Alzahrani et al., 2014). Die eigentliche Funktion der Prozessierung ist bislang noch nicht bekannt. Zunächst soll im Rahmen dieser Arbeit die Translokation und Phosphorylierung des CagA-Proteins in Phagozyten mit Hilfe des GSK-Reportersystems untersucht werden. Dieses GSK-Tag-System wird zur Identifizierung der CagA-Translokation unabhängig von seiner Tyrosinphosphorylierung verwendet. Der Reporter-Tag wird bei erfolgreicher Typ-IV-Translokation in die Zielzelle phosphoryliert. Es soll geklärt werden, in welcher zeitlichen Reihenfolge Prozessierung und Tyrosinphosphorylierung vonstatten gehen.

Um die Prozessierungsstelle zu identifizieren und gegebenenfalls ihr Funktion näher zu charakterisieren, sollen Aminosäuren in dieser Region, innerhalb dieser Arbeit durch ortsspezifische Mutagenese deletiert und durch eine neutrale Aminosäure (Serin) ersetzt werden. Mit einem so veränderten Konstrukt, sollen abermals Translokationsexperimente durchgeführt werden und diese anschließend mit jenen mit intakter Prozessierungsstelle verglichen werden. Die Hypothese dabei ist, dass wenn nach der ortsspezifischen *cagA*-Mutagenese das CagA-Protein immer noch proteolytisch prozessiert wird, diese Region nicht die Prozessierungsstelle ist. Ist dies jedoch die „richtige“ Stelle im *cagA*-Gen soll

anschließend geklärt werden, ob generell die beiden Prozesse der proteolytischen Prozessierung und Thyrosin-Phosphorylierung voneinander unabhängig sind.

Darüberhinaus soll in dieser Arbeit die Interaktion von *H. pylori* Typ-IV-Sekretionssystem und Leukozyten bezüglich der Migrationsfähigkeit der Leukozyten näher untersucht werden. Dazu sollen verschiedene Migrationsassays, wie Boyden-Chamber (zwei- bis dreidimensionaler Ansatz) und Kollagengele (dreidimensionaler Ansatz), zum Einsatz kommen. Unsere Arbeitshypothese ist, dass es durch die beobachtete Migrationshemmung von Leukozyten zu einer verminderten Elimination von *H. pylori*, im Sinne einer Immunmodulation zu Gunsten *H. pylori*, kommt, was wiederum die Persistenz der Infektion begünstigt. Hierzu sollen verschiedene Phagozyten-Zellreihen, wie differenzierte HL60-Zellen und isolierte humane Granulozyten und dendritische Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht werden.



## II Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Bakterienstämme

##### 1.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 2: *Escherichia coli*-Stämme

Stamm/Name	Genotyp und Referenz
DH5 $\alpha$ (E142)	F <sup>-</sup> , ( $\Phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15) $\Delta$ (lacZYAargF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda^-$ <i>thi-1</i> , <i>gyrA</i> 96, <i>relA1</i> (Invitrogen, Karlsruhe) (Hanahan, 1983)
One Shot® TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) ( $\Phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15), $\Delta$ lacO74, <i>recA1</i> , <i>ara</i> $\Delta$ 139, $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> (Invitrogen, Karlsruhe) (Grant <i>et al.</i> , 1990)

##### 1.1.2 *Helicobacter pylori*-Stämme

Tabelle 3: *Helicobacter pylori*-Stämme

Stamm/Name	Genotyp und ggf. Referenz
P12	Klinisches Isolat (888-0) der Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Hamburg (Schmitt und Haas, 1994), Wildtyp-Stamm
P12 Strep	Wie P12, nur mit Streptomycinresistenz
P12 $\Delta$ cagA	<i>cagA</i> -Deletionsmutante (Odenbreit <i>et al.</i> , 2000a), Kan <sup>R</sup>
P12 $\Delta$ PAI	<i>PAI</i> -Deletionsmutante
P12 $\Delta$ VacA	<i>VacA</i> -Deletionsmutante
P12 $\Delta$ cagA, $\Delta$ VacA	<i>cagA</i> - <i>VacA</i> -Doppeldeletionsmutante
P12CagA $\Delta$ N6	Aus dieser Arbeit, Veränderte <i>cagA</i> -Prozessierungsstelle, 6 Asparagin sind durch ein Serin ersetzt
P12pWS321	<i>cagA</i> (aa847-1033)-av3- <i>cagA</i> down,p-Bluscript

P12(CagA-Y5)	GSK- <i>cagA</i> <sub>P12/11637</sub> (pWS266), Veränderte <i>cagA</i> -EPIYA-Motive, 5 Asparagin sind durch 5 Tyrosin-Aminosäuren ersetzt
P12(CagA-F5)	GSK- <i>cagA</i> <sub>P12/11637</sub> (pWS265), Veränderte <i>cagA</i> -EPIYA-Motive, 5 Asparagin sind durch 5 Phenylalanin-Aminosäuren ersetzt
pIP9	GSK- <i>cagA</i> (pIP9)
pIP29	GSK- <i>cagA</i> Δ58-587 (pIP29)
pRL5	GSK- <i>cagA</i> Δ695-1019 (pRL5)
pRL6	GSK- <i>cagA</i> Δ783-1019 (pRL6)
P12(GSK-CagAΔ868-1019)	GSK- <i>cagA</i> Δ868-1019 (pWS269), <i>cagA</i> mit deletierter Prozessierungsstelle und komplett deletierten EPIYA-Motiven

## 1.2 Zelllinien

Tabelle 4: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung und ggf. Referenz
AGS	Humane Magenadenokarzinom-Zelllinie (ATCC CRL-1739)
THP-1	Humane akute Monozytenleukämiezellen (Tsuchiya et al., 1980)
J774A.1	Maus, Monozyten-Makrophagenzelllinie (BALB/c macrophage)
HL-60	Humane aktue promyeloische Leukämiezellen (Collins et al., 1978)

## 1.3 Plasmide und Vektoren

Tabelle 5: Plasmide und Vektoren

Plasmid	Eigenschaften und ggf. Referenz
pP12	<i>H. pylori</i> P12 WT Plasmid
Plasmidvektor 310=p-buescript	<i>ori</i> <sub>ColE1</sub> , <i>ori</i> <sub>f1(+)</sub> , <i>lacZ</i> , M13 forward-/reverse-Primerbindungsstellen, Amp <sup>R</sup> (Stratagene)
pWS311	cagAGSK,pJP99
pWS68=pUC18 buescript	<i>ori</i> <sub>ColE1</sub> , M13 <i>forward</i> - und <i>reverse-primer</i> -Bindungsstellen, (Amp <sup>R</sup> ), (Yanisch-Perron et al., 1985)
pWS336	Chloramphenicolkassette

pCW1	Aus dieser Arbeit
pCW2	Aus dieser Arbeit

## 1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (D, Ulm) bezogen. In der nachfolgenden Tabelle sind die Oligonukleotidsequenzen von 5'-, nach 3'-Ende dargestellt.

**Tabelle 6: Oligonukleotide**

Name	Oligonukleotidsequenz (5' → 3')
HH64	CAG CGG ATC CAT GCT TTA TAA CTA TGG ATT
HH66	GCG GAT CCT TAC TTA TTA AAT AAT TTA TAG
JP67	GGC CGA GCT CGG TAC CTT AAG ATT TTT GGA AAC CAC
RH137	ATA AGA ATG CGG CCG CTT ACG CCC CGC CCT GCC AC
WS319	CGG GAT CCA ACC CTA GTC GGT AAT GGG
WS359	ACC GCT CGA GGT TAT CTT TTG ATT GAT GAT C
WS375	CGG GAT CCT TCA ACT TTA TCA TGC TTT TTC
WS391	ACC TGC GGC CGC TAA AGT GGA ATT TCA TGC
WS452	GCG GTA CCG TCG ACG ATC TTG AAA AAT CTC TAA AGA AAC
WS453	AGT GGA CTC AAA AAC GAA CCC ATT TAT G
WS454	GAA ATT TCC AAG TTT TGC ATT C

## 1.5 Antikörper

### 1.5.1 Primäre Antikörper

**Tabelle 7: Primäre Antikörper**

Antikörper	Beschreibung und eingesetzte Verdünnung
$\alpha$ -CagA (AK257)	Polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen CagA-Bereich von <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen) (W. Fischer), 1:5000
$\alpha$ -P-Tyr (PY99)	Monoklonaler Antikörper gegen Tyrosinphosphorylierte Proteine (Maus), Santa Cruz Technologies (Santa Cruz, USA), 1:2000

$\alpha$ -P-GSK (P-GSK)	Polyklonales Antiserum gegen GSK-Fusionsprotein (Kaninchen) (W.Fischer) 1:1000
$\alpha$ -CD16	Monoklonaler Antikörper gegen humanes CD16 (vornehmlich vorhanden auf Granulozyten; Miltenyi Biotec)
$\alpha$ -CD66abce	Monoklonaler Antikörper gegen humanes CD66abce (vornehmlich vorhanden auf Granulozyten; Miltenyi Biotec)
$\alpha$ -CD11c	Monoklonaler Antikörper gegen humanes CD11c (vornehmlich vorhanden auf Dendritischen Zellen; BD)
$\alpha$ -CD86	Monoklonaler Antikörper gegen humanes CD86 (vornehmlich vorhanden auf Dendritischen Zellen; BD)
$\alpha$ -CD83	Monoklonaler Antikörper gegen humanes CD83 (vornehmlich vorhanden auf reifen/maturierten Dendritischen Zellen; BD)

### 1.5.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung und eingesetzte Verdünnung
$\alpha$ -Maus IgG-AP	Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Kaninchen) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1:10000
$\alpha$ -Maus IgG-POX	Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege) (Dianova, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1:5000
$\alpha$ -Kaninchen IgG-POX	Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege) (Dianova, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1:10000

### 1.6 Enzyme und Proteine

AP (Alkalische-Phosphatase)-gekoppeltes Protein A (Sigma-Aldrich, USA); *DpnI*-Endonuklease (Stratagene, USA); Takara-Taq-Polymerase (TaKaRa Bio Inc., J); *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene, USA); Fötale Kälberserum (FCS) (PAA, A); Pferdeserum (Invitrogen, USA); Lysozym (Roche, D); Proteinase K (Merck, D); Restriktionsenzyme (Roche, D), bovines Kollagen I (Advanced Biomatrix, USA).

## 1.7 Molekulargewichtsmarker

Tabelle 9: Molekulargewichtsmarker

Anwendung	Marker
DNS-Gelelektrophorese	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas, D)
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Prestained Protein Molecular Weight Marker, SM0441 (MBI Fermentas/Thermo Fisher, D)

## 1.8 Medien, Platten und Zusätze

Die verwendeten Nährmedien wurden mit entsalztem und filtriertem Reinstwasser aus einer Anlage (Memtech, D) produziert und mit Hilfe eines Wasserdampfhochdruckautoklaven (Sterimaquet™, Maquet/Getinge, D) für 20 min bei 1,013 x 10<sup>5</sup> Pascal Überdruck und 121°C sterilisiert. Zusätze, die dieser Hitze nicht standgehalten hätten, wurden sterilfiltriert (Sterilfilter 0,2 µm Porengröße; Millipore, D) und den Medien nach dem Autoklavierprozess, bei einer maximalen Restwärme von 55 °C unter sterilen Bedingungen beigelegt.

Tabelle 10: Medien, Platten und Zusätze für Bakterien und Zellkultur

Medium	Herstellung
LB-Medium	20g/l Lennox-L-Medium (Gibco/Invitrogen, USA), autoklaviert
LB-Platten	32 g/l Lennox-L-Agar (Gibco/Invitrogen, USA), autoklaviert
Serumplatten	36 g/l GC-Agar-Basis (Oxoid, D), autoklaviert, nachträglich Zugabe von 10 ml/l Vitamin-Mix, 80 ml/l Pferdeserum, 10 mg/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprim, 1 mg/l Nystatin
Brucella Medium (BB, <i>Brucella Broth</i> )	28 g/l Brucella Broth (Falcon BD, USA), autoklaviert

Vitaminmix	100 g/l $\alpha$ -D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l LCystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoessäure, 0,25 g/l Nicotinamidadeninindinucleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12, 1,1 g/l LCystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil
SOC Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,0 mit NaOH eingestellt, autoklaviert, Zugabe von 20 mM (Endkonzentration) Glucose
Einfriermedien für  <i>E. coli</i>  <i>H. pylori</i>	  LB-Medium, 20% Glycerin  Brucella-Medium, 20% Glycerin, 10% FCS
RPMI Medium	RPMI 1640 mit L-Glutamin und 10% FCS (Thermo Fisher, USA)
PBS	PBS Dulbeccos's ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat
TBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
TE	Trypsin-EDTA (1:10) (Gibco, Invitrogen)
DMSO	Sigma-Aldrich, USA

## 1.9 Antibiotika und Antimykotika

Tabelle 11: Antibiotika und Antimykotika

Hemmstoffe und Zusätze (Abkürzung)	Arbeitskonzentration
Chloramphenicol (Cam)	30 $\mu$ g/ml ( <i>E. coli</i> ), 6 $\mu$ g/ml ( <i>H. pylori</i> )
Erythromycin (Erm)	250 $\mu$ g/ml ( <i>E. coli</i> ), 10 $\mu$ g/ml ( <i>H. pylori</i> )
Streptomycin (Strep)	250 $\mu$ g/ml ( <i>E. coli</i> und <i>H. pylori</i> )

Vancomycin (Van)	50 µl/l ( <i>H. pylori</i> )
Trimetoprim	100 µl/l ( <i>H. pylori</i> )
Kanamycin (Kan)	8 µg/ml ( <i>H. pylori</i> )
Nystatin (Nys)	220 µl/l ( <i>H.pylori</i> )

### 1.10 Puffer und Lösungen

#### Puffer und Lösungen für die Elektroporation von *H. pylori*

Elektroporationspuffer      272 mM Saccharose, 15% Glycerin, 2,43 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
0,57 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### Puffer und Lösungen für Infektionsexperimente

PBS                              PBS Dulbeccos's ohne Calcium, Magnesium und  
Natriumbicarbonat

PBS\*                             PBS mit Inhibitoren

Inhibitor-Lösung              1 mM Na-Vanadat, 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin, 1  
µM Pepstatin, PIC 1 (Phosphatase-Inhibitor- Cocktail von  
Sigma)

#### Puffer und Lösungen für analytische und präparative Auftrennung von DNA

TAE-Puffer                      40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 7,5

Ethidiumbromidfärbebad    1 mg/l Ethidiumbromid in Wasser

Methylenblaulösung          1 g/l Methylenblau

GEBS-Puffer                    20% Glycerin, 0,05% Bromphenol, 50 mM EDTA, 0,5%  
N-Laurylsarkosin

#### Puffer und Lösungen für Enzymreaktionen

10 x A-Puffer	33 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 0,5 mM DTT, pH 7,9
10 x H-Puffer	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, 1 mM DTE, pH 7,5
10 x L-Puffer	100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10mM DTT, pH 7,5
Ligations-Puffer	66 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7,5
PCR-Puffer	160mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 670mM Tris-HCl(pH 8,8, 25 °C) 0,1% Tween 20
10 x Mutagenese-Puffer	200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100 mM KCl, 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20 mM MgSO <sub>4</sub> , 1% (v/v) Triton® X-100, 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA)

#### Puffer und Lösungen für SDS-PAGE

2 x SDS-Pobenpuffer	50 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
Acrylamidlösung	29% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgel-Puffer	1,0 M Tris-HCl, pH 6,8
Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

#### Puffer und Lösungen für Western-Blot

Western-Transfer-Puffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol, pH 8,3
TBS	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5



Detektionslösung	0,1 M Tris-HCl, 7 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 g/l NBT, 50 mg/l BCIP, pH 9,6
Anoden-Puffer 1	0,3 M Tris-HCl, 10% (v/v) Methanol, pH 10,4
Anoden-Puffer-2	25 mM Tris-HCl, 10% (v/v) Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer	25 mM Tris-HCl, 10% (v/v) Methanol, 40 mM 6-Amino-n-Caprinsäure oder Glycin, pH 9,4
Wasch-Puffer	10 mM Tris-HCl, 0,9% (w/v) NaCl, 0,2% (v/v) Tween20, pH 7,4
Absättigungs-Puffer	50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5% (w/v) Magermilchpulver, 0,1% (v/v) Tween20, pH 7,4
Verdünnungs-Puffer	Waschpuffer mit 1% (w/v) Magermilchpulver

#### Puffer und Lösungen für Kollagengele

10 x MEM	(Modified Eagle Medium, Thermofisher, USA)
----------	--

### **1.11 Chemikalien**

Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30%) (Roth, D), Agarose (Sigma-Aldrich, USA), Ammoniumsulfat (Roth, Karlsruhe, D), ATP (Roche, D), 5-Brom-3-chlor-3'-indolylphosphat-ptoluidinsalz (BCIP) (Roth, D), Bromphenolblau (Serva, D), Brucella-Medium (Becton Dickinson, D), Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, D), Chloramphenicol (Serva, D), Desoxyribonukleinsäure-Triphosphat-(dNTPs)-Mix (Roche, D), DMSO (Sigma-Aldrich, USA), EDTA (Sigma-Aldrich, USA), Ethanol (Carl Roth, D), Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, USA), Glycerin (Roth, D), Histopaque®-1077 und -1119 (Sigma-Aldrich, USA), Isopropanol (Carl Roth, D), Kanamycin (Merck, D), Lennox-L-LB-Agar (Invitrogen, USA), Leupeptin (Sigma-Aldrich, USA), Methylenblau (Serva, D), Natriumlaurylsulfat (SDS) (Roth, D), Natrium-Orthovanadat (Serva, D), NNN'-N'-Tetramethyldiamid (TEMED) (Sigma-Aldrich, USA), Nitrotetrazoliumblauchlorid (NBT) (Roth, D), PBS Dulbecco's (Invitrogen, USA), Pepstatin (Sigma-Aldrich, USA), Paraformaldehyd (PFA)

(Sigma- Aldrich, USA), PMSF (Sigma-Aldrich, USA), RPMI 1640-Medium mit Glutamin (Invitrogen, USA), Sephadex G-50 (GE Healthcare, USA), Trimethoprim (Sigma-Aldrich, USA), Triton X 100 (Sigma-Aldrich, USA), Trypan Blau (Invitrogen, USA), Tween20 (Serva, D), Vancomycin (Sigma-Aldrich, USA), Western Lightning<sup>TM</sup> Detektionsreagenz (Merk/Milipore, D)

## **1.12 Hilfsmittel, Geräte und Apparaturen**

### **1.12.1 Hilfsmittel**

Cell Culture Inserts, pore size 3 µm (BD Falcon, USA), Deckgläser (Menzel, D), 96-DeepWell-Block (2,2ml) (ABgene, UK), 96-DeepWell-Block (1,2ml) (ABgene, UK), Einfrierröhrchen (Nalgene, D), Einmal-Spritzen Omnifix® 20 ml (Braun, D) Elektroporationsküvetten (Eurogenetec, D), Eppendorfgefäße (Eppendorf, D), Expositionskassetten für Röntgenfilme (Kodak, D), Falcon Röhrchen 15ml, 50ml (Falcon, BD, USA), Filterpapiere (Whatman, UK), Glasperlen 3mm (Omnilab, D), Pipetten und -einmalspitzen (Gilson, USA), Petrischalen (Greiner, A), PVDF-Membran (Bio-Rad, USA), Nitrocellulose-Filter (Millipore, D), Objektträger (Langenbrinck, D), Röntgenfilme Super RX (Fuji Film, D), Quick-Seal<sup>TM</sup>-Röhrchen (Beckmann Coulter Inc., USA), Trackingkammern (µ-Slide VI<sup>0.4</sup> oder µ-Slide Chemotaxis <sup>3D</sup>)(Ibidi, D), Zellkulturflaschen/-schalen (Falcon BD, USA), 0,2 µm-Sterilfilter (Josef Peske GmbH, D), Zellkulturflaschen (Nunc, D) Zellschaber (Falcon, BD, USA).

### **1.12.2 Geräte und Apparaturen**

Agarosegelkammern Wide Mini-Sub® cell (Bio-Rad, USA), Brutschränke (Binder, Scholzen, D), Durchflusszytometer (BD, USA), Elektroporationsgerät Gene Pulser<sup>TM</sup> (Bio-Rad, USA), -80°C Gefriertruhe (Heraeus, D), Geldokumentationssystem Quantity One 4.4.0 (BioRad, USA), Gelelektrophoresesystem Mini-Protean IIITM (Bio-Rad, USA), Heizblöcke (Techne, UK), Kühlschrank (Liebherr, D), Magnetrührer mit Heizung MR 3001 (Heidolph, D), Lichtmikroskop (Olympus, D), Life Cell Mikroskop (Leica, D), Mikrowelle (AEG, D), pH-Meter ProfiLine pH 197i (WTW, D), Photometer Libra S12 (Biochrom), Rollmischer (Assistent), Schüttelinkubatoren Certomat R BS-1 (Braun Biotech/Sartorius BBI Systems, D), Schüttler (Eppendorf, D), Spannungsquellen Power Pac 300 (BioRad, USA),

Spectrophotometer NanoDrop (Peglab, D), Sterile Werkbank (BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH, D), Thermocycler Microcycler Personal (PCR-Gerät) (Perkin Elmer, D), Ultrazentrifuge Optima™ TL (Rotoren TLA45) (Beckman Coulter Inc., USA), Vakuumzentrifuge Savant SpeedVac DNA 110 (GMI, USA), Tischzentrifugen (Megafuge 1.0R, Biofuge 15R, Biofuge 15) (Heraeus, D), Vortex Gene 2 (Scientific Industries), Waagen (Biotech Fischer, D), Wasserbäder 1012 (GFL, D), Western Blot-Apparatur *semi-dry* (Biotech Fischer, D), Zentrifuge RC5C Plus (Rotoren SS34, SLA3000) (Sorvall, D).

### 1.13 Kommerziell erworbene Kits

**Tabelle 12: Kommerziell erworbene Kits**

Kit	Firma
ExSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene®, USA
illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE-Healthcare, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit™	Qiagen, D
QIAamp DNA Mini Kit™	Qiagen, D
TOPO-TA-Cloning®-Kits mit dem pCR2.1-TOPOVektor	Invitrogen, D

## 2 Methoden

### 2.1 Bakterienkultur

Für die Kultur von *E. coli* Bakterien wurden Luria-Bertani-(LB) Agarplatten verwendet, welchen fakultativ Antibiotika zur Selektion zugesetzt waren. Diese Platten wurden bei 37 °C über Nacht im Inkubator bebrütet. Zur Konservierung der Stämme wurden die Bakterien, welche auf einer ¼ bis ½ Platte gewachsen waren in 1ml LB-Flüssigmedium + 20% Glycerin resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

Serum-Platten, wahlweise auch antibiotikahaltige Serumselektivplatten wurden für die Kultur von *H. pylori* verwendet. Diese wurden unter mikroaerobem Milieu (10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 85% N<sub>2</sub>) bei 37°C für 24 bis 48 h bebrütet.

Zur Erhaltung der Stämme wurden Bakterien von ½ bis einer dicht bewachsenen Platte mit einem Wattestäbchen in 1ml Brucella-Medium + 20% Glycerin + 10% FCS resuspendiert und anschließend bei -70°C eingefroren.

Beim erstmaligem Ausstreichen einer Gefrierkultur wurden die Platten unter den oben genannten Bedingungen zunächst drei Tage bebrütet und anschließend einmal weitergestrichen, ehe sie bei Experimenten Verwendung fanden.

### 2.2 Infektion von Zellen mit *H. pylori*

In einem ersten Schritt wurden Bakterien in PBS suspendiert. Hierfür wurden Bakterien von einer dicht bewachsenen Agarplatte mit einem sterilen Wattestäbchen abgeschabt. Dieses wurde nun vorsichtig in ein Eppendorfgefäß mit 1ml PBS gestreift. Nun wurde die so entstandene Bakteriensuspension 1:50 verdünnt. Davon wurde mittels Photometer, nach dem Eichen, die Optische Dichte (OD) bei einer Absorption von 550 nm bestimmt. Bei den durchgeführten Infektionen von 2 ml Zellsuspension, war eine OD von 0,1 erwünscht, was ungefähr dem Verhältnis Bakterien zu Zellen von 100:1 entspricht, also einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 100. Die errechnete Menge an Bakteriensuspension wurde zu den Zellen, beispielsweise THP-1, zupipettiert. Anschließend wurden die Zellen 4 h bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 4 h wurden die Zellen-BakterienSuspensionen in Eppendorfgefäße überführt und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Eppendorfgefäße wurden auf Eis gestellt

und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml PBS\* resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei gleichen Bedingungen und wiederholtem Absaugen, wurde das Pellet in 30 µl PBS\* aufgenommen. Dazu wurden 30 µl SDS-PAGE-Puffer (2x) zugegeben. Anschließend wurde 2-Mercaptoethanol bis zu einer Konzentration von 5% (v/v) zugefügt und die Proben 10 min bei 95°C aufgekocht und ein letztes Mal zentrifugiert.

### **2.3 Arbeiten mit Zellkulturen**

Die humane, akute Monozytenleukämiezelllinie THP-1, stellt ein gutes Modell zur Untersuchung von Phagozyten dar. Morphologisch handelt es sich um runde, einzeln und zum Teil in Clustern gelegene Zellen in Suspension. Die Kultivierung der THP-1 Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>, in 90 % RPMI-Medium + 10 % FBS in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 35-50 h. Die Kultur wurde etwa jeden 2. bis 3. Tag gesplittet, so dass sich eine Zellanzahl von ca.  $1 \times 10^6$  pro ml ergab. Für die Infektionen wurden die Zellen in 6-Well-Platten überführt, mit  $1,2 \times 10^6$  Zellen pro Well.

Die Kultivierung der HL-60 Zellen erfolgte mit 90 % RPMI-Medium + 10 % inaktiviertes FCS, bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C. Es handelt sich hierbei um Zellen einer humanen, akuten myeloischen Leukämie. Diese sind kleine, einzelne und runde Zellen und befinden sich in Suspension. Sie haben eine Verdopplungszeit von etwa 25 h. Das Besondere an dieser Zelllinie ist die Möglichkeit einer Differenzierung, mittels einmaliger Gabe von 1,25 % DMSO, zu Makrophagen (Collins et al., 1978). Dieser Vorgang dauerte ca. 6-7 Tage.

### **2.4 Neubauer Zählkammer**

Die Neubauer Zählkammer ist eine Methode zur mikroskopischen Bestimmung der Zellzahl pro ml. Zuerst wurde die Oberfläche der Zählkammer und das Deckglas vorsichtig mit 70 %-igem Ethanol gereinigt. Anschließend wurde das Deckglas leicht angefeuchtet und mit moderatem Druck auf die Zählkammer geschoben. Dieses muss fest anhaften, was an den Newtonschen Ringen zu erkennen ist, welche bei korrektem Sitz auftauchen. 10 µl Zellsuspension und 90 µl Trypanblau (Mischverhältnis 1:10) wurden gut suspendiert und davon 10 µl in die Zählkammer gefüllt. Anhand von Kapillarkräften saugt sich die Suspension in den Zwischenraum zwischen Kammer und Deckglas. Nun mikroskopiert man mit einem 10-er Objektiv und unterscheidet dabei die toten (Zellwand zerstört, Trypanblau kann eindringen, Zellen erscheinen tiefblau) von den lebenden Zellen. Nur die lebenden Zellen

wurden beim Zählen berücksichtigt. Die Zählkammer ist in neun große Quadrate unterteilt von denen mindestens vier ausgezählt wurden. Daraus wurde ein Mittelwert gebildet und dieser mit  $10^5$  multipliziert. Es ergibt sich die Zellanzahl pro ml Ausgangssuspension.

## **2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE nach Laemmli ist eine biochemische Methode zur Auftrennung von Proteinen der Größe nach innerhalb eines elektrischen Feldes (Laemmli, 1970). Die denaturierten Proteine wurden vorher mit SDS (sodium dodecyl sulfate), einem anionischen Detergens behandelt. Somit wird gewährleistet, dass alle Proteine eine negative Ladung annehmen und nunmehr ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld nur noch von ihrer Molekülmasse abhängt. Die Auftrenngröße des Gels wird hierbei vom Gehalt (in %) des Acrylamids bestimmt. Bei der Durchführung der analytischen Gelelektrophoresen wurden vertikale Gelelektrophoresesysteme Mini-Protean III <sup>TM</sup> von BioRad verwendet. Zunächst wurde das Trenngel gegossen, bis ca. 3 cm unterhalb des Glaskassettenrandes eingefüllt und mit Wasser luftdicht abgeschlossen. Je nach den erwarteten Proteingrößen wurden 6, 8, 10 oder 12 %-ige Trenngele verwendet. Nach ca. 15 min war das Trenngel vollständig polymerisiert und es konnte das in der Zwischenzeit angefertigte Sammelgel (5 %), nach Abziehen des Wassers, eingegossen werden. Das zuoberst liegende Sammelgel unterstützt das bessere Einlaufen der Proteine und hat darüber hinaus die Funktion die Proteine am Ende des Sammelgels zu konzentrieren. Zum Bilden der Geldaschen wurden Plastikämme mit mehr oder weniger starken Zinken verwendet, welche nach dem Polymerisieren des Sammelgels entfernt wurden. Nach vorsichtigem Einsetzen der Gelkassette in die Elektrophoresekammer wurde diese mit Elektrophoresepuffer befüllt. Abschließend wurden die Taschen mithilfe einer feinen  $\mu$ l- Spritze mit je 5-10  $\mu$ l Proteinproben beladen. Die elektrische Auftrennung dauerte ca. zwei Stunden bei einer angelegten Spannung von 100 V in der ersten viertel Stunde (zum Einlaufen und Aufkonzentrieren der Proteine am Ende des Sammelgels) und 130 V in der verbleibenden Zeit (zum Auftrennen).

**Tabelle 13: Rezept der Sammel- und Trenngele für SDS-PAGE**

	Trenngel (für 5 ml) [ml]				Sammelgel (für 1 ml) [ml]
	6%	8%	10%	12%	5%
Acrylamid/Bis (30%)	1,0	1,3	1,7	2,0	0,17
Trenngelpuffer	1,3	1,3	1,3	1,3	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	-	0,13
H <sub>2</sub> O	2,6	2,3	1,9	1,6	0,68
SDS (10%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01
APS (10%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01
TEMED	0,0004	0,003	0,002	0,002	0

## 2.6 Western-Blot

Beim Western-Blot-Verfahren nach Towbin et al. (1979) werden die zuvor geelektrisch aufgetrennten Proteine des Polyacrylamidgels mit Hilfe eines Semi-Dry-Graphitplattensystems elektrophoretisch auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) -Membran übertragen. Dazu benötigt man zwei dicke Filterpapiere, welche in Anode- I -Puffer getaucht wurden und auf die Anode gelegt werden. Darüber wurden zwei dünnere in Anode- II -Puffer getränkte Filterpapiere geschichtet. Über diese Konstruktion wurde das SDS-Gel mit der, durch Methanol aktivierten und durch Anode- II -Puffer getränkten, PVDF-Membran als Unterseite gelegt. Letztendlich wurde das Gel mit zwei dünnen und zwei dicken in Kathode-Puffer -getränkten Filterpapieren bedeckt, um den Kontakt mit der Kathode zu bereiten. Der so ermöglichte Proteintransfer erfolgte bei  $1\text{mA/cm}^2$  für 1 Std.

### Immunodetektion immobilisierter Proteine

War der Proteintransfer abgeschlossen, wurde die Membran in einem 50 ml Reaktionsgefäß, für ca. 1-2 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht (ÜN) bei 4 °C auf einem Rollmischer, 5 ml Absättigungspuffer ausgesetzt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Als nächstes wurde dem Reaktionsgefäß mit der Membran der erste Antikörper in entsprechender Verdünnung (in 5 ml Verdünnungspuffer) zugesetzt und 2 h bei RT inkubiert. Anschließend folgten mehrere (vier bis sechs) Waschschritte mit je 5ml TBS/0,5 % (v/v) Tween20 für je 5 min, um überschüssigen Antikörper zu entfernen.

Im Anschluss wurde mit dem 2. Antikörper (POX- oder Protein A-gekoppelt) in entsprechender Verdünnung 1 h bei RT inkubiert. Erneut folgten vier bis sechs, wie oben beschriebene, Waschschritte.

#### Entwicklung mit AP-Konjugaten

Die vorbehandelte Membran wurde in einer Schale mit 10 ml Detektionslösung geschwenkt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Abschließend wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit Wasser gestoppt.

#### Entwicklung mit POX-Konjugaten

Um eine sensitivere Detektion der Proteinbanden über Chemilumineszenz zu ermöglichen, wurden spezielle Detektionsreagenzien eines Kits (Milipore Immobilon, Deutschland) für Western Blots verwendet. Je 2 ml der beiden Detektionsreagenzien wurden in eine Plastikschiene, in der sich die Membran befand, pipettiert und die Membran darin geschwenkt. Anschließend legte man die so behandelte Membran zwischen eine luftblasenfreie, durchsichtige Folie, um zu verhindern, dass Flüssigkeit austritt. Dieses Konstrukt wurde in eine Expositionskassette gelegt und anschließend in der Dunkelkammer entwickelt. Dazu legte man einen Röntgenfilm über die Membran in die Expositionskassette, für 5 bis 120 sec. und entwickelte anschließend den so belichteten Film in einer Röntgenfilmentwicklungsmaschine.

### **2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)**

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, selektive Abschnitte einer DNA-Sequenz zu vervielfältigen. 50 µl Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes setzten sich folgendermaßen zusammen.



**Tabelle 14: Reaktionsgemisch PCR**

3 µl	Matrizen-DNA
Je 1 µl	Oligonucleotide (100pmol/µl)
5 µl	10 x PCR-Puffer
3 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (= 1,5 mM)
8 µl	1,25 mM aller dNTP (= 0,2 mM)
29 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
0,25 µl	Taq-DNA-Polymerase

Zumeist kam folgender Reaktionszyklus zum Einsatz: 1min Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 94 °C, Anlagerung der Oligonukleotide bei 50-51 °C für ca. 45 sec. Anschließend Polymerisation bei 72 °C für 2 min (hierbei gilt ca. 1min/1000bp). Die Zyklusanzahl betrug ca. 30. Die Spezifität der Reaktion wird durch genau komplementäre Oligonukleotide gewährleistet. Diese lagern sich an die zu amplifizierenden Einzelstränge an und dienen der hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase thermophiler Bakterien als Primer. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden nach Zugabe von GEBS-Puffer (im Verhältnis **1:1**, Puffer:PCR-Probe) mit Hilfe eines TBE-Agarosegels bezüglich ihrer Größe analysiert und anschließend aufgereinigt.

## **2.8 DNA-Fragmentisolation und -aufreinigung**

Die DNA-Aufreinigung nach PCR, Restriktionsenzymverdauen oder präparativem Agarosegel erfolgte gemäß den Herstellerangaben des illustra<sup>TM</sup> GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit der Firma GE.

## **2.9 Plasmid-DNA-Präparation**

Zur Isolation und Reinigung von Plasmid-DNA, welche anschließend für Transformationen in *H. pylori* benutzt wurden, wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit nach dem Protokoll des Herstellers (QIAGEN) verwendet. Zur Eluierung aus der Säule wurden 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> benutzt.

## **2.10 Analytische Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli* nach der Kochmethode**

Mit Hilfe der Koch-Methode kann Plasmid-DNA aus *E. coli* schnell isoliert werden (Holmes und Quigley, 1981). Hierfür wurde eine Einzelkolonie auf einer antibiotikahaltigen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 28 °C oder 37 °C inkubiert. Nun wurde eine Impföse voll Bakterienmaterial in 300 µl STET-Puffer suspendiert. Nach Hinzufügen von 15 µl Lysozymlösung wurde die Zellsuspension für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben 1 min lang im Wasserbad gekocht, wodurch die Zellen lysiert wurden. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 15.000 x g wurden die Zelltrümmer und die chromosomale DNA, welche sich im Sediment befanden mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Dem Überstand, welcher die Plasmid-DNA enthielt, wurden 200 µl Isopropanol zugesetzt. Dieses Gemisch wurde 10 min bei -20°C inkubiert und dann 10 min bei 15.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment im Anschluss mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Schließlich wurde die Plasmid-DNA 10 min in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und der Rückstand in 50 µl sterilem, destilliertem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

## **2.11 Präparation von chromosomaler *H. pylori*-DNA**

Zur Präparation von nukleärer DNA aus *H. pylori*-Bakterien wurde das QIAamp DNA Mini Kit von QIAGEN verwendet. Es wurden die Bakterien von ca. einer ¼ gut bewachsenen Agarplatte gemäß der Gebrauchsanweisung verarbeitet.

## **2.12 Restriktionsenzymverdau**

Der DNA-Restriktionsenzymverdau geschah in einem Volumen von 10 µl in der Regel für analytische, bzw. von 60 µl für präparative Zwecke. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem 10 µl Ansatz 0,1-0,5 µg DNA und 2,5-5,0 U Restriktionsenzym und in einem 60 µl Ansatz 3-

5 µg DNA und 15 U Restriktionsenzym. Ersteres wurde 2-3 h bei 37 °C im Heizblock, letzteres wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Wenn bei den simultanen Restriktionsenzymverdauen mit mehreren Enzymen nicht der gleiche Puffer verwendet werden konnte, wurde zwischen den einzelnen Reaktionen eine Zentrifugationsentsalzung zum Abtrennen von Salzen, Nukleotiden und kurzen DNA-Fragmenten vorgenommen. Die Enzyme wurden vorher bei 65 °C inaktiviert. Vor einer Ligation wurden die so verdauten DNA-Fragmente auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und anschließend gereinigt.

### **2.13 Zentrifugationsentsalzung**

Das ausschlusschromatographische Verfahren der Zentrifugationsentsalzung ist dazu geeignet rasch Salze, Nukleotide und kleine DNA-Fragmente von größeren DNA-Stücken abzutrennen. Ein 1,5 ml Eppendorfgefäß diente als Säule. Am Boden des Gefäßes wurde zunächst mit einer heißen Kanüle (0,4 mm) ein Loch gebohrt, welches als Abfluss fungierte. Anschließend wurde zuunterst zum Zwecke der Abdichtung, ein Tropfen silikonisierter Glasperlen pipettiert (ca. 20 µl). Als nächstes wurde die Säule mit suspendiertem Säulenmaterial (Sephadex G-50) aufgefüllt. Das so vorbereitete Eppendorfgefäß wurde auf ein zweites leeres Eppendorfgefäß gesetzt und 2min bei 2400g zentrifugiert.

Anschließend wurde die Säule zur Äquilibration mit 100 µl destilliertem Wasser beladen und in oben genannter Weise zentrifugiert. Abschließend wurde die zu entsalzende Lösung auf das Konstrukt pipettiert und einer erneuten Zentrifugation zugeführt. Die entsalzte Lösung konnte im unteren Eppendorfgefäß aufgefangen werden.

### **2.14 Ligation**

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde ein Reaktionsansatz bestehend aus 1µl Ligationspuffer (10 x), geschnittener Vektor-DNA und DNA-Fragment (im Verhältnis Vektor:Fragment von ca. 1:4) nach Zugabe von 1U Ligase bei 4 °C ÜN inkubiert.

## 2.15 Kontraselektionsmethode nach Dailidienne *et al.* 2006 (nach Etablierung durch Rohrer S., 2010)

Der Vorteil der Kontraselektionsmethode ist es DNA-Sequenzen ohne weitere Schwierigkeiten zwischen *H. pylori*-Stämmen zu verschieben, ohne das hierbei eine Medikamentenresistenz-Eigenschaft im gewünschten Konstrukt zurückbleibt. So kann verhindert werden, dass Gene, die stromabwärts des sonst üblicherweise eingebrachten Resistenzmarkers liegen möglicherweise in ihrer Expression und Translation durch diesen alteriert werden. Ein diesbezüglich entwickeltes System enthält eine Genkassette welche die Gene *rpsL* aus *Campylobacter jejuni* (*rpsL<sub>Cj</sub>*) und *erm*, welches eine Erythromycinresistenz darstellt kombiniert. Hierbei ist der als Ausgangskonstrukt verwendete *H. pylori*-Stamm gegenüber Streptomycin resistent ( $\text{Str}^R$ ) und Erythromycin empfindlich ( $\text{Erm}^S$ ). Wird nun darin die *rpsL-erm*-Genkassette eingebracht wird die Mutante Streptomycin sensibel ( $\text{Str}^S$ ) und Erythromycin resistent ( $\text{Erm}^R$ ), wobei sich die hierraus entstehenden Zellklone nunmehr durch Wachstum auf Nährböden mit Erythromycin-Antibiose, bei gleichzeitiger Unfähigkeit auf Streptomycin-Platten zu wachsen, auszeichnen. Die dahintersteckende Rationale ist die dominante Funktion des *rpsL<sub>Cj</sub>*-Gens in Streptomycin-resistenten Stämmen. Bei Deletion der *rpsL-erm*-Kassette aus dem Genom, oder bei Austausch derer gegen ein anderes DNA-Fragment fehlt dem Bakterium die, durch das *rpsL<sub>Cj</sub>*-Gen vermittelte, Dominanz der Streptomycin-Sensitivität. Die mutierten Bakterien wachsen nunmehr wieder auf Streptomycin-Platten.

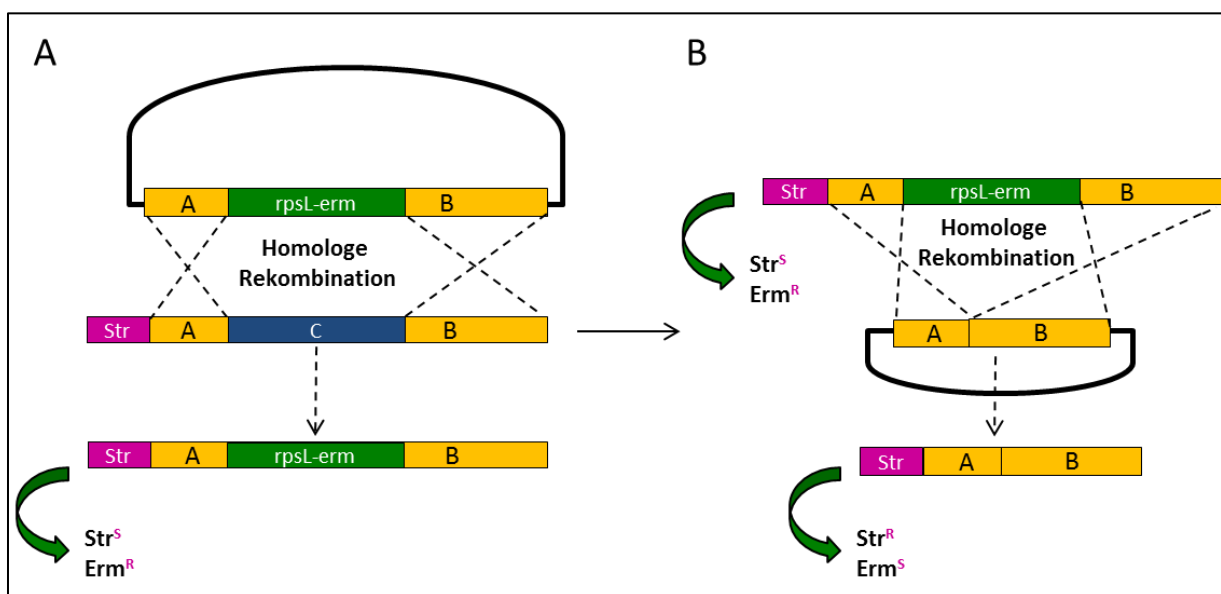


Abbildung 4: Modifizierte Darstellung der Kontraselektionsmethode aus Rohrer S., 2010

Teil A der Abbildung zeigt die homologe Rekombination eines *rpsL*-erm-tragenden *H. pylori*-Stammes mit einem Streptomycin-Resistenz-tragenden *H. pylori*-Stamm und das daraus resultierende Konstrukt eines mit darin enthaltener *rpsL*-erm-Kassette und einer durch das dominante *rpsL*-Gen ausgeschalteten Streptomycin-Kassette. Dieser Stamm ist somit sensibel auf Streptomycin und Erythromycin resistent. Teil B der Abbildung zeigt die Situation bei erneuter homologer Rekombination und konsekutivem Wegfall der *rpsL*-erm-Kassette mit daraus resultierendem *H. pylori*-Stamm mit wiederhergestellter Streptomycin-Resistenz.

## **2.16 Transformation von *E. coli***

Zum einen fand die chemische Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode (Sambrook et al., 1982) Verwendung. Dabei wurde ein Aliquot (50 µl) kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut mit maximal 5 µl Plasmid-DNA versetzt. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis gestellt um anschließend einem 90-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C im Heizblock unterzogen zu werden. Danach folgte eine 1-minütige Inkubation auf Eis. Das Gemisch wurde mit SOC-Medium (Super Optimal Broth with Catabolic repression) zur Ausbildung einer Antibiotikaresistenz auf 1 ml aufgefüllt und 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator gelassen. Abschließend wurde entweder eine 10 oder 90 %-ige Lösung der so behandelten *E. coli*-Bakterien auf LB-Selektivplatten ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank ÜN inkubiert. Zum anderen wurde um die Transformationseffizienz zu erhöhen superkompetente, kommerziell erhältliche TOP 10 *E. coli*-Bakterien mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen) verwendet. Die Transformation wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.16.1 Elektroporation von *E.coli*-Bakterien (Shigekawa und Dower, 1988)**

40 µl elektrokompetenter *E.coli*-Bakterien wurden aus -70 °C genommen und langsam auf Eis aufgetaut. Ebenso wurden die Elektroporationsküvetten auf Eis kühl gestellt. Zu den Bakterien wurden 0,8-1 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA dazupipettiert und die Mischung wurde in die vorgekühlten Elektroporationsküvetten überführt. Der Elektroporationspuls erfolgte bei 2,5 kV (Spannung), 200 Ω (Widerstand) und 25 µF (Kapazität) mit Hilfe einer GenePulser™ Apparatur (Bio Rad). Anschließend wurden die Bakterien ohne Zeitverzug in 1 ml LB-Medium resuspendiert und bei 37 °C 1 h geschüttelt. Abschließend wurden Verdünnungen der elektroporierten Bakterien auf Selektivplatten ausplattiert und bei 37 °C ÜN inkubiert.

## **2.17 Transformation von *H. pylori***

*H. pylori* besitzt eine natürliche Kompetenz bezüglich der Aufnahme von DNA, sodass meist keine Vorbehandlung nötig ist (Haas et al., 1993). Abhängig vom DNA-Konstrukt war aber die Transformationseffizienz unterschiedlich, weswegen zum Teil doch auch andere Formen der Transformation-wie zum Beispiel die Elektroporation-angewandt wurden.

### **2.17.1 Transformation von *H. pylori* (Haas et al., 1993)**

Der Transformationsansatz bestand aus Bakterien, die von einer Platte mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen und sodann in 1 ml BB + 10 % FCS suspendiert wurden. Für die Transformation wurde eine OD<sub>550</sub> von 0,2-0,3 eingestellt. Ebendiese Menge an Bakterien wurde mit 1 ml BB + 10 % FCS pro Reaktionsansatz in je ein Well einer 24-Well-Platte gefüllt. Die Well-Platte wurde nun 1-2 h bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Bakterien mittels Lichtmikroskopie auf ihre Motilität überprüft. Anschließend wurden 5-10 µl Plasmid-DNA dazugegeben und der Transformationsansatz für weitere 4-6 h bei den oben genannten Bedingungen inkubiert. Danach wurde der Ansatz in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1000 x g 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abdekantiert worden war, wurde das Pellet in 100 µl BB-Medium aufgenommen und die Suspension auf Selektiv-Serumplatten ausplattiert. Diese wurden abschließend für drei bis sechs Tage bebrütet.

### **2.17.2 Elektroporation von *H. pylori*-Bakterien (Segal und Tompkins, 1993)**

Analog zur oben beschriebenen Elektroporation von *E. coli*-Bakterien wurden auch hier die Elektroporationsküvetten zunächst auf Eis vorgekühlt. *H. pylori* wurde mit einem sterilen Wattestäbchen von einer dicht bewachsenen Platte in 1 ml sterilem PBS suspendiert. Die OD<sub>550</sub> der Suspension wurde bestimmt und auf einen Wert von 1 pro ml eingestellt. Die Zellen wurden 5 min bei 1000 x g in PBS abzentrifugiert, anschließend zweimal mit 500 µl Elektroporationspuffer gewaschen und schließlich in 40 µl Elektroporationspuffer aufgenommen. Nun wurden dem Ansatz 1-2 µl Plasmid-DNA zugefügt und das Ganze in die Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte wiederum bei 2,5 kV , 200 Ω und 25 µF mit Hilfe einer GenePulser<sup>TM</sup> Apparatur (Bio Rad). Nach dem elektrischen Impuls wurden die Bakterien schnellstmöglich in ein vorbereitetes Eppendorfgefäß mit 1 ml BB-

Medium + 10 % FCS gegeben und anschließend in eine 12-oder 24 Well-Platte überführt. Diese wurde 4 h bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> bebrütet bevor die Suspensionen 5 min bei 1000 x g zentrifugiert wurden. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Medium resuspendiert und auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die Inkubation bei mikroaerobem Milieu dauerte drei bis sechs Tage.

## **2.18 Ortsspezifische Mutagenese mit Hilfe des ExSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene®)**

Die ortsspezifische Mutagenese des oben erwähnten Kits ist eine Methode zur Herstellung von spezifischen Mutationen in doppelsträngiger DNA. Zunächst wurde eine PCR durchgeführt, wobei mindestens einer der beiden Primer am 5'-Ende phosphoryliert war. Durch die Phosphorylierung wird später eine ausreichende Ligationseffizienz bewirkt. 45 µl des PCR-Produktes wurden nun ohne vorherige Aufreinigung weiterverarbeitet, indem sie mit 5 µl Mutagenesepuffer (10 x Dpn I-Puffer), 1 µl Dpn I-Endonuklease und 1 µl Pfu-Polymerase gemischt wurden. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37°C und anschließend 30 min bei 72 °C im Heizblock inkubiert. Die Dpn I-Endonuklease schneidet methylierte DNA, welche nur im Ursprungsplasmid (Methylierung findet nur bei der Replikation in Bakterien statt, nicht aber bei der PCR) vorkommt. Die Pfu-DNA-Polymerase sorgt für sogenannte *blunt ends* (stumpfe/glatte Enden), welche später fehlerfreier und passgenau ligiert werden können, sodass es nicht zu ungewünschten Leserasterverschiebungen kommt. Der Ansatz wurde einer Zentrifugationsentsalzung unterzogen und abschließend wurden 10 µl davon mit 1 µl Ligations-Puffer durch Zugabe von 1 µl DNA-Ligase über Nacht bei 4°C ligiert.

## **2.19 Granulozytennachweis durch Färbungen**

### **2.19.1 Hämatoxylin/Eosin (HE) –Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine der Standardfärbungen für Gewebe und Zellen, welche erstmals von Wissowzky A. 1876 in dieser Kombination benutzt wurde. Dabei ist die Hämatoxylinkomponente (basisch) für die Kernfärbung und die Eosinkomponente (sauer) für die Färbung des Zytoplasmas verantwortlich. Zur Herstellung von Dünnschichtpräparaten wurde nach der Granulozytenisolation 100 µl von der Zell-Medium-Suspension in eine Zytospinkammer gegeben, welche sich getrennt durch eine Filterkarte, auf einem Objektträger

befand. Durch Zentrifugation mit 500 rpm für 3 min wurden die Zellen auf den Objektträger transferiert. Der Objektträger wurde nun für 3-5 min ins Hämatoxylinbad getaucht, kurz mit destilliertem Wasser abgespült und danach unter fließendem Leitungswasser gebläut, bis das Wasser sauber war. Im Anschluss folgten eine 30-sekündige Eosinfärbung und eine erneute Spülung mit destilliertem Wasser. Nun wurde das Präparat luftgetrocknet und dann gegebenenfalls mit Kaisers-Glycerin-Gelatine eingedeckelt. Unter dem Lichtmikroskop stellten sich die Zellkerne blau und das Zytoplasma rot dar, wobei der gelappte, eingeschnürte Kern und die Granula im Zytoplasma der Granulozyten gut erkennbar waren.

### **2.19.2 Giemsa Färbung**

Die Giemsa- wird ähnlich der oben beschriebenen HE-Färbung zur besseren Darstellung von Zellkernen und Granula genutzt. Hierzu wurden neutrophile Granulozyten, welche zuvor auf einen gereinigten Objektträger zentrifugiert worden waren (siehe oben), 3 min in Methanol fixiert und anschließend 30 min in einer 1:20 mit Phosphatpuffer verdünnten Giemsalösung gefärbt. Anschließend wurde der Objektträger mit destilliertem Wasser gespült.

### **2.20 DNA-Sequenzierung**

Mit Hilfe der Kettenabbruchreaktion nach Sanger ist es möglich, die genaue Abfolge der Basen zu bestimmen (Sanger et al., 1977). Die Methode basiert auf einer Polymerasekettenreaktion. Dem Reaktionsansatz werden jedoch zusätzlich fluoreszent markierte Nukleotid-Analoga, sogenannte Terminatoren, beigelegt. Werden diese in die DNA eingebaut, so führt das zum Kettenabbruch. Im Gemisch der neu synthetisierten DNA entstehen durch den Abbruch DNA-Fragmente von unterschiedlicher, jedoch genau definierter Länge, mit je einem fluoreszierenden Terminator am 3'-Ende. Die so entstandenen Fragmente werden mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. So gelingt es, die Position der einzelnen Basen in der zu untersuchenden DNA aufzuschlüsseln. Die DNA-Sequenzierungen wurden bei der Firma GATC Biotech (Kempten, D) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Konzentrationsbestimmung der zu sequenzierenden Plasmid-DNA mit Hilfe eines Nanodrop-Gerätes (Peqlab, D). Die gewünschte Konzentration für Plasmid-DNA betrug 50 ng/µl welche in 30 µl Reinwasser gelöst wurden. Als Primer wurden für die zu untersuchende



DNA-Sequenz spezifische Oligonukleotide gewählt, welche in einer Konzentration von 10 pmol/µl ebenfalls in 30 µl Reinwasser aufgenommen wurden.

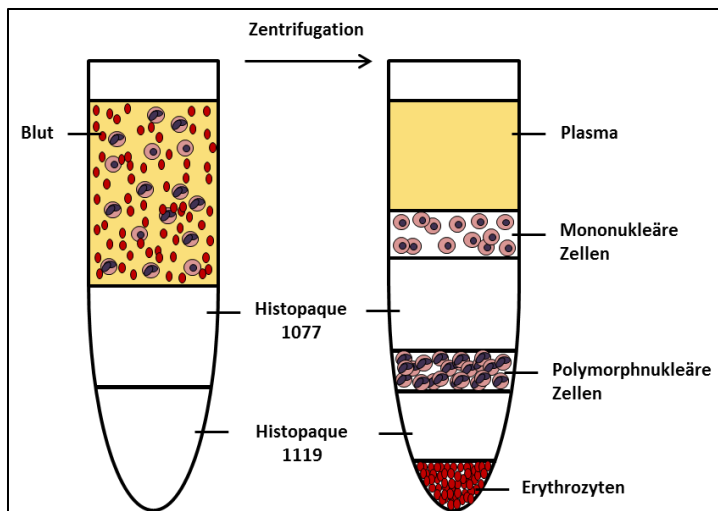
## **2.21 Zellisolation aus Vollblut**

Von gesunden freiwilligen Spendern wurde Blut abgenommen, wobei darauf zu achten war, diesen Vorgang langsam und mit Vorsicht auszuführen, unter anderem auch deshalb, damit die Zellen nicht beschädigt oder zu viel Stress ausgesetzt wurden. Um die Gerinnung zu verhindern, wurden 100 µl Heparin (Sigma, D) pro 10 µl Vollblut verwendet. Insgesamt wurden 40 – 75 ml Vollblut abgenommen, je nachdem welche Zellpopulation isoliert werden sollte.

### **2.21.1 Zelltrennung der Dichte nach mittels Histopaque®-Gradienten (Sigma-Aldrich)**

#### **2.21.1.1 Granulozytenisolierung**

Um Granulozyten von den restlichen Blutbestandteilen zu separieren wurde ein Dichtegradient verwendet. Dieser bestand aus zwei Histopaquelösungen®, 1119 und 1077, welche aus Polysaccharose und radioopakem Medium bestehen und je eine spezifische Dichte von 1,077 und 1,119 besitzen. Jeweils 3 ml von der Histopaque® 1119 Lösung wurden in ein 15 ml Gefäß gefüllt. Darüber wurden 3 ml Histopaque® 1077 Lösung pipettiert und anschließend wurden über diesen doppelten Gradienten behutsam 6 ml des heparinisierten Vollblutes geschichtet. Die so vorbereiteten Gefäße wurden 30 min bei 738 x g zentrifugiert. Die Zentrifuge wurde vorher auf 4 °C heruntergekühlt um die Stoffwechselprozesse der Zellen gering zu halten. Die Bremse der Zentrifuge war ausgeschaltet, um den empfindlichen Gradienten nicht durch Bremskräfte zu zerstören. Nach der Zentrifugation sollten die Granulozyten, welche sich nun bedingt durch ihre relativ hohe Dichte an der Grenzfläche der beiden Histopaquelösungen befinden, schnell in 10 ml PBS aufgenommen werden.



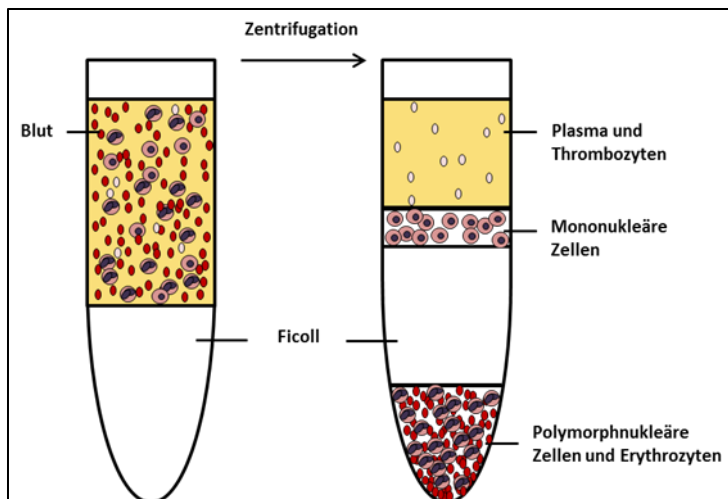
**Abbildung 5: Histopaque®-Dichtegradienten vor (links) und nach Zentrifugation (rechts)**

Links im Bild zuunterst dargestellt ist der Dichtegradient bestehend aus den Histopaquelösungen® 1119 und 1077, sowie darüber gelegen 6 ml heparinisiertes Vollblut, wohingegen rechts im Bild der Zustand nach Zentrifugation und Auftrennung der Blutsäule abgebildet ist. Hierbei kommen von unten nach oben Erythrozyten, die Histopaquelösung® 1119, polymorphnukleäre Zellen, die Histopaquelösung® 1077, mononukleäre Zellen und Plasma zur Darstellung.

Die mit den 10 ml PBS wurden auf Eis gekühlt. Die so gewonnenen und in 10 ml PBS suspendierten Granulozyten werden zweimalig 5 min bei  $294 \times g$  und  $4^\circ C$  zentrifugiert und somit von den Histopaquelösungen gereinigt. Im Anschluss wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Zwar sind die Erythrozyten normalerweise zuunterst im Gradienten anzutreffen, doch ist eine geringe Kontamination in der Granulozytenschicht möglich. Die Lyse erfolgte mit 6 ml sterilem, pyrogenfreiem Wasser (Ampuwa) für 30 sec. Danach wurden 2 ml 3,6 %-ige NaCl-Lösung dazugegeben, was auf das gesamte Volumen eine physiologische NaCl-Konzentration von 0,9 % ergibt. Das Gemisch wurde abermals bei den zuvor genannten Bedingungen abzentrifugiert, wobei die erfolgreiche Lyse nach der Zentrifugation am rot verfärbten Überstand erkennbar war. Abschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml RPMI Medium + 5 % FCS aufgenommen und auf Eis gelagert. Zuletzt schloss sich eine Zählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer an. Im Mittel konnten aus 40 ml Blut  $8 \times 10^6$  Granulozyten gewonnen werden. Mit Hilfe der FACS-Zellanalyse konnte eine Reinheit der Granulozytenpopulation von 93% festgestellt werden.

### 2.21.1.2 Monozytenisolierung

Monozyten können sich unter bestimmten Umständen zu Makrophagen und dendritischen Zellen weiterentwickeln. Dendritische Zellen wiederum sind gewebsständige Makrophagen welche nach Antigenkontakt in die drainierenden Lymphgefäße einwandern. So gelangen sie zu den regionären Lymphknoten und initiieren dort die Immunantwort. Monozyten sind im peripherem Blut bei gesunden Individuen sehr viel seltener anzufinden, als Granulozyten. Sie machen dort nur etwa 2-8 % der zellulären Bestandteile aus. Daher benötigt man ca. 75 ml Vollblut um eine ausreichende Anzahl an Zellen zu gewinnen. Die Blutabnahme erfolgte wie weiter oben beschrieben, nur wurde darauf geachtet, eine Kanüle mit größerem Durchmesser zu verwenden, da es bei dieser Menge an Blut leicht zu Verklumpungen im Lumen der Kanüle kommen kann. Nach der Abnahme wurden die 75 ml Vollblut mit 135 ml PBS verdünnt. Nun wurden in je eines von sechs 50 ml 15 ml Ficoll<sup>®</sup> (Dichte 1,077 g/ml) gefüllt. Darüber wurden behutsam 35 ml Blut-PBS-Gemisch geschichtet. Der Gradient wurde ohne Bremse 35 min bei 401 x g zentrifugiert. Danach wurde die Monozytenschicht abgesaugt, in ein sauberes Gefäß überführt und mit Bremse bei 294 x g für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Pellet dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen und nach jedem Waschen wie im vorigen Schritt abzentrifugiert. Das Monozytenpellet wurde als nächstes in 5 ml RPMI + 2 % inaktiviertes FCS aufgenommen und auf drei 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflaschen mit je 10 ml Medium verteilt. Danach wurden die Flaschen für eine Stunde bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit waren die Monozyten adhärent, während die übrigen Bestandteile, wie Erythrozyten und T-Zellen abgesaugt werden konnten. Die Monozyten wurden anschließend mit 10 ml PBS bedeckt, die Flaschen gut geschüttelt und das PBS wieder abgesaugt. Dieser Schritt wurde zur Entfernung der restlichen Monozytenfremden Zellen dreimal durchgeführt. Abschließend wurden die Monozyten wieder mit je 10 ml Medium pro Zellkulturflasche bedeckt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen, welche sich nun wieder in Suspension befanden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Im Mittel konnten aus 75 ml Blut ca.  $1,4 \times 10^6$  Monozyten gewonnen werden.



**Abbildung 6: Ficoll®-Dichtegradienten vor (links) und nach Zentrifugation (rechts)**

Links im Bild zuunten dargestellt ist der Ausgangszustand mit zuunten eingefüllter Ficolllösung®, sowie darüber gelegtem 35 ml Vollblut-PBS-Gemisch, wohingegen rechts im Bild der Zustand nach Zentrifugation und Auftrennung der Blutsäule abgebildet ist. Hierbei kommen von unten nach oben ein Gemisch von Erythrozyten und polymorphkernigen Zellen, die Ficolllösung®, mononukleäre Zellen und Plasma mit Thrombozyten zur Darstellung.

## 2.22 Differenzierung von Monozyten in Dendritische Zellen

Unter bestimmten Stimuli differenzieren sich Monozyten *in vivo* zu dendritischen Zellen (Serbina et al., 2008; Geissmann et al., 2010). Diese Bedingungen lassen sich auch *in vitro* nachstellen. Hierzu wurden der Monozytenzellsuspension am Tag nach der Isolation 50 ng GM-CSF (granulocytes monocytes-colony stimulating factor) und 50 ng IL-4 (Interleukin 4) beigesetzt. Anschließend wurden die Zellen für zwei Tage bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Am dritten Tag nach der Isolation, wurde das ganze Medium (RPMI + 2 % inaktiviertes FCS) ausgewechselt und abermals 50 ng GM-CSF und 50 ng IL-4 zugefügt. Nach weiteren zwei Tagen Inkubation wurden 75 % des Mediums durch frisches Medium ersetzt und der Suspension 37,5 ng GM-CSF, 37,5 ng IL-4 sowie 0,01 µg/ml LPS (Lipopolysaccharid) zugegeben. Am achten Tag nach der Isolation waren die Zellen durch diese Behandlung zu reifen dendritischen Zellen differenziert und konnten nun für Migrationsexperimente verwendet werden.

## 2.23 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

### 2.23.1 Verwendung als Zellanalyseinstrument

Mit Hilfe eines FACS-Gerätes lassen sich einzelne, solide Strukturen -meist Zellen- bezüglich ihrer Größe, Granularität, Eigenfluoreszenz und ihrer fluoreszenzmarkierten

Oberflächenstrukturen charakterisieren und somit einzelnen Zellpopulationen qualitativ und quantitativ zuordnen. Hierzu wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern versehen, welche an die jeweiligen Oberflächenstrukturen der erwarteten Zellpopulation binden sollten. Die verschiedenen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe emittieren jeweils Licht einer bestimmten Wellenlänge, das durch Filtereinstellungen am Gerät von Detektoren in ein elektrisches Signal einer bestimmten Stärke umgewandelt werden kann. Dies geschieht indem Fluoreszenzmarkierte Zellen in einem flüssigen Medium eingesaugt werden und einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Jedoch ist zu beachten, dass Zellen auch eine mehr oder weniger ausgeprägte Eigenfluoreszenz aufweisen können. Diese muss, falls vorhanden, als Ausgangswert gemessen werden (Zellen ohne fluoreszenzmarkierte Antikörper) und von den Ergebnissen der fluoreszenzgekoppelten Zellen subtrahiert werden. Granularität und Größe der Zellen werden durch die Streuung des Laserstrahles definiert. Weisen die Zellen beispielsweise eine hohe Granularität auf, so wird das Laserlicht vermehrt zur Seite gestreut. Dies schlägt sich im Faktor des sogenannten *sidescatters* (SSC) nieder. Werden die Laserstrahlen nach vorne abgelenkt, so ist dies ein Maß für die Größe der Zellen und spiegelt sich im sogen. *forwardscatter* (FCS) wieder. Die nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten Antikörper bei humanen isolierten Granulozyten. Um sicherzugehen, dass keine unspezifische Bindung von Antikörpern vorlag, wurde als Negativkontrolle ein PE-gekoppelter Maus IgM-Antikörper verwendet.

**Tabelle 15: Antikörper bei humanen isolierten Zellen**

Oberflächenstruktur	Vorkommen	Fluoreszenzfarbstoff/ Hersteller
CD 16	Natürliche Killerzellen, Makrophagen, Mastzellen, neutrophile Granulozyten	FITC/ Milteny Biotec, D
CD 66 abce	Neutrophile Granulozyten	PE/ Milteny Biotec, D

Die nächste Tabelle zeigt die verwendeten Antikörper bei dendritischen Zellen. Als Negativkontrolle wurde ein PE-gekoppelter Maus IgG-Antikörper verwendet.

**Tabelle 16: Antikörper bei dendritischen Zellen**

Oberflächenstruktur	Vorkommen	Fluoreszenzfarbstoff/ Hersteller
CD 11c	Hohe Expression auf dendritischen	PE/ BD, USA

	Zellen, schwache Expression auf T- und B-Zellen, HL60	
CD 83	Reife (mature) dendritische Zellen	FITC/ BD, USA
CD 86	Alle dendritische Zellen	FITC/ BD, USA

Die letzte Tabelle zeigt die verwendeten Antikörper bei HL60-Zellen. Als Negativkontrolle wurde hier ein PE-gekoppelter Maus CD 3 Antikörper verwendet.

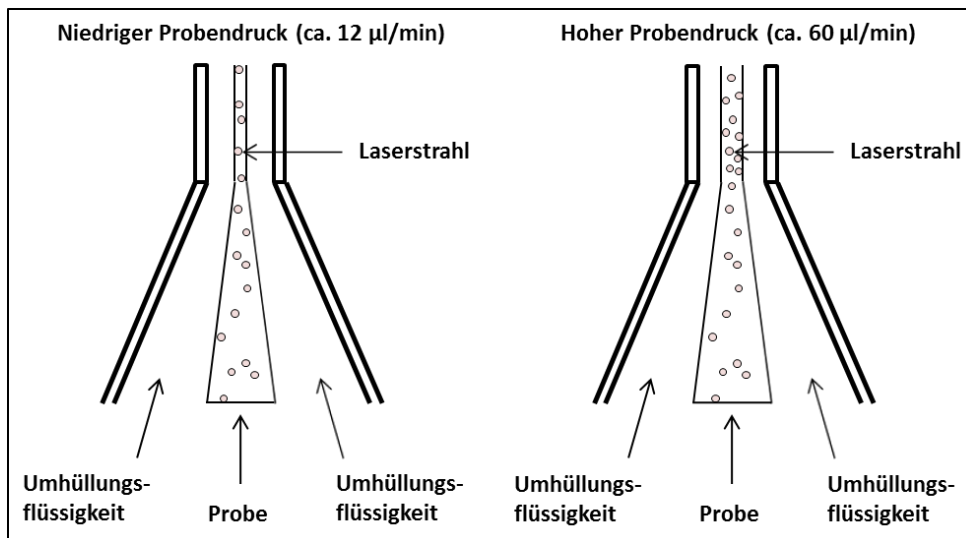
**Tabelle 17: Antikörper bei HL60-Zellen**

Oberflächenstruktur	Vorkommen	Fluoreszenzfarbstoff/ Hersteller
CD 11 c	Siehe oben	PE/ BD, USA
CD 18	Differenzierte HL60	PE/ BD, USA

Für die FACS-Analyse werden  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 96-Wellplatte benötigt. Diese Zellanzahl wird in 100 µl FACS-Puffer gelöst, in ein Well gegeben und mit den jeweiligen Antikörpern in einer Verdünnung von 20:1 (= ca. 5 µl Antikörper) eine Stunde im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Insgesamt wurden die Wellplatten danach dreimal bei 300 x g 5 min lang, mit Bremse abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet erneut in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Nach der dritten Zentrifugation wurde die Zellsuspension in ein vorgekühltes FACS-Röhrchen überführt und mit zusätzlichen 150 µl FACS-Puffer vermengt. Abschließend konnten die Messungen am FACS Gerät von BD (BD FACS Canto® II) durchgeführt werden.

### 2.23.2 Verwendung als Zellzählinstrument

Abhängig vom Druck mit dem die Probe in das FACS Gerät gepresst wird, zählt die Apparatur mehr oder weniger genau die Zellanzahl. Desto mehr Druck eingestellt wird, desto schneller wird die Probe analysiert. Im Gegenzug nimmt jedoch die Genauigkeit der Zellzählung ab. Wird die Messung jedoch mit geringem Druck, genannt *sample pressure*, durchgeführt, so ist es möglich jede einzelne Zelle als solche zu detektieren und als sogenanntes, *event* zu zählen. Dies nimmt ca. sieben Minuten pro Probe in Anspruch.



**Abbildung 7: Situation der Probenmessgenauigkeit in Abhängigkeit des Probendrucks**

Bei niedrigem Probendruck verläuft die Messung langsamer, jedoch genauer (linke Seite), bei hohem Probendruck verläuft die Messung schneller, jedoch ungenauer (rechte Seite). Skizze in Anlehnung an die Abbildungen (Figure 2-1 und 2-2) aus „Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide“, Kapitel 2, S.10, BD, [http://medicine.yale.edu/labmed/cellsorter/start/Introduction\\_66019\\_284\\_10028.pdf](http://medicine.yale.edu/labmed/cellsorter/start/Introduction_66019_284_10028.pdf)

## 2.24 Chemotaxis Assays

### 2.24.1 Boyden Chamber

Die nach dem Erfinder benannte Boyden Chamber ist eine Methode zur Untersuchung von Chemotaxis und Zellmigration (Boyden, 1962). Die Boyden Chamber besteht zum einen Teil aus einer Wellplatte. In die einzelnen Wells werden kleinere Einsätze (Inserts), deren Boden eine Membran mit definierter Porengröße darstellt, gesetzt. Im unteren Kompartiment befindet sich Zellmedium, das mit Chemoattraktans versetzt ist. Im Insert, also im oberen Kompartiment, befindet sich eine Suspension aus neutrophilen Granulozyten und Medium. Es entsteht ein chemischer Gradient, welchem die Zellen durch Migration folgen. Die Größe eines neutrophilen Granulozyten beträgt ca. 10 µm, wohingegen sich die Porengröße der Membran nur auf 3 µm beläuft. Dies führt dazu, dass sich die Granulozyten, um durch die engen Poren entlang dem chemischen Gradienten migrieren zu können, aktiv verformen müssen. Somit stellt die Boyden Chamber in diesem Ansatz eine Form der Migration zwischen zwei- und dreidimensional dar. Es wurde eine 24-Wellplatte und Inserts (BD Falcon<sup>TM</sup> Cell Culture Inserts) mit einer Porengröße von 3 µm der Firma BD Falcon verwendet. Als Lockstoff wurde fMLP in einer Konzentration von 100 nM verwendet. Dies ist ein Stoffwechselnebenprodukt aus drei Aminosäuren, welches in geringen Mengen von Bakterien selbst produziert wird. Es wurden Vorexperimente durchgeführt, die zeigten, dass fMLP ein besseres Chemoattraktans für neutrophile Granulozyten und differenzierte HL60-

Zellen ist als IL-8. Des Weiteren wurde bei diesen Vorexperimenten gezeigt, dass eine Konzentration von 100 nM mit der stärksten Chemotaxis korreliert (Daten im Ergebnisteil gezeigt). Die Zellzahl pro Insert betrug  $5 \times 10^5$  bei Granulozyten und  $1 \times 10^6$  bei differenzierten HL60-Zellen, außer sie war bei der Isolation dazu zu gering, was jedoch nur selten der Fall war. Es wurden verschiedene MOI (zwischen MOI 20 und MOI 1) getestet. Darüber hinaus wurden einige Boyden-Chamber-Experimente mit einer gewissen Vorinkubation (1-2 h) von Immunzellen und *H. pylori*-Bakterien durchgeführt. Dies gewährleistete eine sichere Translokation und Prozessierung von Virulenzfaktoren, wie z.B. CagA, in die Zellen. Als Medium wurde RPMI + 10%FCS verwendet. Im Insert befanden sich 200 µl Medium, im Well 700 µl Medium mit oder ohne Chemoattraktans versetzt. Die Dauer des Experiments betrug 1-2 h. Wenn keine differenzierten HL60 Zellen verwendet wurden, wurden zunächst humane neutrophile Granulozyten aus dem peripheren Blut isoliert und aufbereitet (siehe oben). Danach wurden verschiedene *H. pylori*-Stämme von der Hälfte einer gut bewachsenen Serumplatte geerntet und in Suspension gebracht. Die Wells wurden zuerst befüllt, danach wurden die Inserts vorsichtig hineingelegt. Zuletzt wurde mit aller Behutsamkeit, um die Zellen nicht zu beschädigen, die Zell-, oder Zell-Bakterien-Suspension in die Inserts pipettiert. Danach wurde der Ansatz bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Falle einer Vorinkubation wurde die Zell-Bakterien-Suspension bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für eine gewisse Zeit in den Brutschrank gestellt, bevor sie anschließend in die Inserts pipettiert wurde. Nach der Inkubation wurde die Wellplatte mikroskopiert um einen ersten Eindruck der Zellmigration zu gewinnen. Anschließend wurden die Inserts vorsichtig aus den Wells entfernt und die Zellzahlen im unteren Kompartiment der Boyden-Chamber per Neubauer-Zählkammer oder FACS gezählt. Die folgende Abbildung zeigt eine Skizze eines Boyden-Chamber-Experiments.

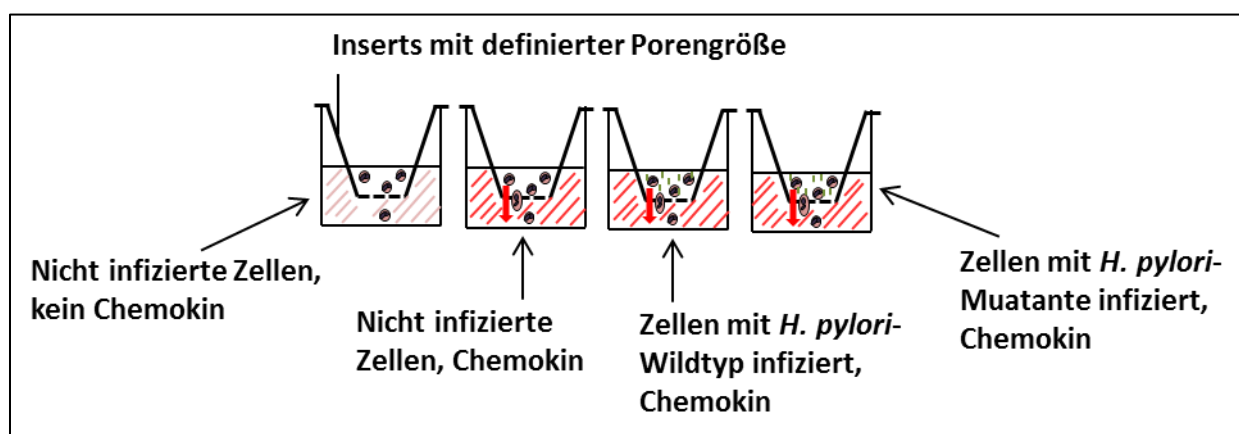


Abbildung 8: Skizze eines Boyden-Chamber-Experiments



Hierbei entstehen durch Einsetzen der Inserts in die 24-Well Platte zwei durch die porentragende Membran der Inserts getrennte Kompartimente. Im unteren Kompartiment ist Medium mit oder ohne Chemokinzusatz, im oberen Kompartiment hingegen Zellen mit oder ohne *H. pylori*-Infektion eingefüllt. Die roten Pfeile deuten die Migration in Richtung Chemokinstimulus an.

## 2.24.2 Kollagengele

Kollagen ist ein natürlicher Bestandteil des menschlichen Stütz- und Bindegewebes. So kommt es in unterschiedlichen Formen in fast allen Gewebearten, unter anderem auch in der Magenmukosa vor. Gerade innerhalb einer unter anderem kollaghaltigen dreidimensionalen Matrix von Schleimhäuten befinden sich zahlreiche Abwehrzellen des Körpers, so auch neutrophile Granulozyten. Um die Migration von Phagozyten so gut wie möglich zu studieren, wurden Kollagengele gegossen. Diese bestanden aus einer Kollagenstocklösung welche sich aus 5 µl Natrium-Bicarbonat (7,5 %), 10 µl MEM (10 fach) und 75 µl Kollagen Typ I (vom Rind) zusammensetzt.

Das Verhältnis von Zellen in Medium zu Kollagenstammlösung betrug 1:2. Die Zellzahl pro Ansatz betrug  $3,3 \times 10^5$  pro Kollagenkanal bei Granulozyten und differenzierten HL60. Beim Mischen war darauf zu achten, keine Blasen zu bilden, da diese sonst im Kollagengel verbleiben. Wie schon bei den Boyden-Chamber-Experimenten beschrieben wurden auch hier verschiedene MOI getestet. Als Trackingkammern wurden Produkte der Firma Ibidi (D, Martinsried), wie zum Beispiel µ-Slide VI<sup>0.4</sup> verwendet. Diese wurden von einem Ende aus mit der Kollagen-Zell-Lösung befüllt und 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert um die Lösung zum Stocken zu bringen. Anschließend wurde am anderen Ende der Trackingkammer, in ein Reservoir, fMLP als Stimulus gegeben. Nach 10 min, in denen der Stimulus durch das gefestigte Gel diffundieren und einen Chemokingradienten bilden konnte, wurde mit dem Filmen der Zellen begonnen. Gefilmt wurden die Kollagengele mit einem Spinning Disk-*Live-Cell*-Mikroskop (Leica, D). In der Filmkammer des Mikroskops wurde ein Milieu von ca. 5 % CO<sub>2</sub> und ca. 60 % Luftfeuchtigkeit eingestellt. Es wurde ein Abstand zwischen den einzelnen Bildern von 5 sec eingestellt. Die gesamte Dauer des Films betrug zwischen 5 und 10 Minuten. Gefilmt wurde mit einem 10 x Objektiv. Anschließend wurden die Filmdateien mit dem Programm „Image J“ ausgewertet.

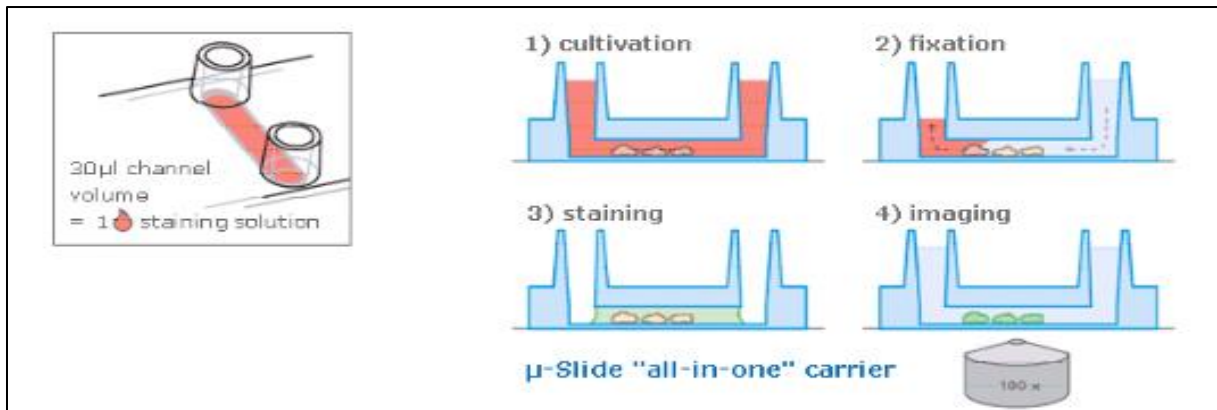


Abbildung 9: μ-Slide VI0.4-Trackingkammern der Firma Ibidi (D, Martinsried, Bild entnommen aus Internetseite der Firma Ibidi: <http://ibidi.com/xtpproducts/en/ibidi-Labware/Channel-Slides/m-Slide-VI-0.4>)

Diese können zu verschiedenen Zwecken verwendet werden, so können unter anderem Zellen in Lösungen, hinsichtlich der Migration, gefilmt werden (4).

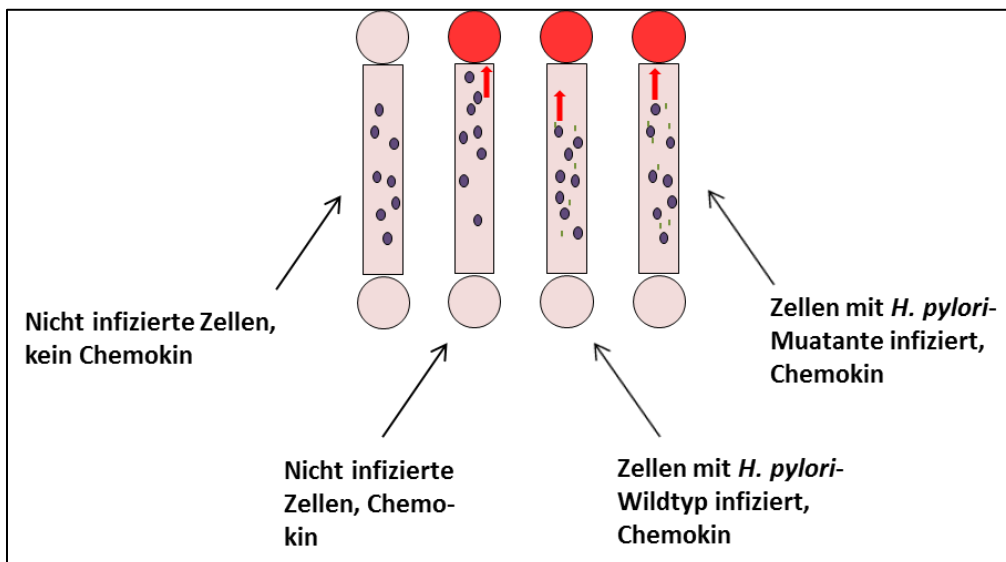


Abbildung 10: Skizze eines Kollagengel-Experiments

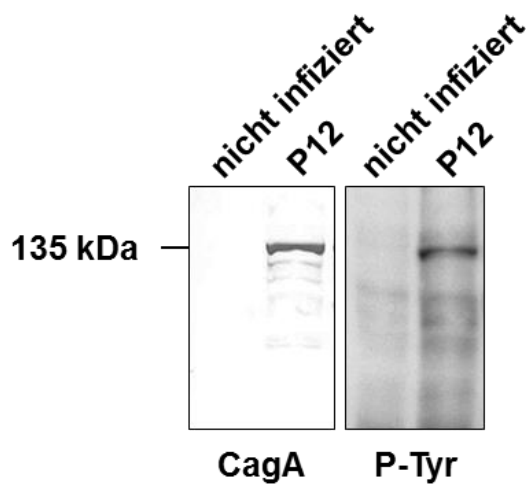
Hierbei werden Trackingkammern der Firma Ibidi (D, Martinsried) verwendet, wobei diese mit einer Kollagen-Zell-Lösung befüllt werden. Diese Lösung beinhaltet in einigen Ansätzen auch *H. pylori*-infizierte Zellen und wird nach dem Befüllen für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wird am anderen Ende der Trackingkammer Medium mit oder ohne Chemokinzusatz eingefüllt. Die roten Pfeile deuten die Migration in Richtung Chemokin stimulus an.

### III Ergebnisse

#### 1 Untersuchung der Translokation und der Phosphorylierung von CagA in Magenepithelzellen und Leukozyten

Die Magenmucosa ist anatomisch gesehen der Ort, an dem *H. pylori*, gegebenenfalls nach Auflösung der tight junctions zwischen den Epithelzellen, in Kontakt mit den dort vorhandenen Zellen des Immunsystems kommt. Diese Zellen sind beispielsweise neutrophile Granulozyten, Makrophagen und in einem geringeren Prozentsatz auch dendritische Zellen. Durch die Experimente von Odenbreit et al. war bereits bekannt, dass das Effektorprotein CagA (Odenbreit et al., 2001) in Phagozytenzelllinien, wie in Epithelzelllinien transloziert wird, jedoch im Gegensatz zu den letztgenannten in Phagozyten zusätzlich in ein ca. 35 kDa und ein ca. 100 kDa großes Fragment prozessiert wird. Um diesen Sachverhalt zu reproduzieren und die Unterschiede in der CagA-Translokation und -Phosphorylierung von *H. pylori*-infizierten Magenepithelzelllinien, Phagozytenzelllinien und humanen frischisolierten Granulozyten zu charakterisieren, wurden zunächst verschiedene Infektionsexperimente durchgeführt, und die CagA-Translokation mittels Western Blot bestimmt.

Dazu wurden zunächst Zellen der Magenepithelzelllinie AGS in 6 Well-Platten ausgesät und nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% unter Standardbedingungen mit *H. pylori*-P12 infiziert oder uninfiziert belassen. Zelllysate dieser Zellen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, und mit dem Phosphotyrosin-Antikörper PY99, bzw. zur Kontrolle mit einem CagA-Antikörper entwickelt (Abb. 11).

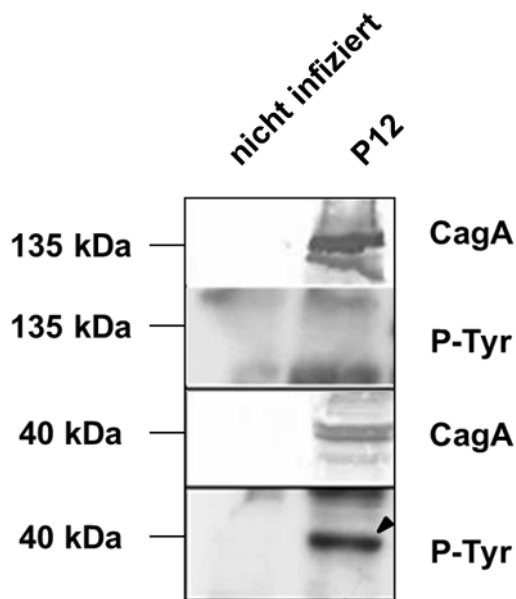


**Abbildung 11: Translokation von CagA in Magenepithelzellen (AGS)**

AGS-Zellen wurden mit dem *H. pylori*-Wildtypstamm P12 bei einer MOI von 100 für 4 h infiziert, oder uninfiziert belassen. Ganzzelllysate der entsprechenden Ansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen CagA (AK257, linke Seite) bzw. einem Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosinreste (PY99, rechte Seite) entwickelt.

Abbildung 11 zeigt, dass das CagA-Protein des *H. pylori*-Stammes P12 als Volllängenprotein (135 kDa) in die Epithelzelllinien transloziert, jedoch hier nicht in ein 100 kDa- und ein 35 kDa-Fragment gespalten wird. Der Phospho-Tyrosin-Blot zeigt dementsprechend nur ein Signal bei 135 kDa, also im Bereich des Volllängenproteins. Nicht infizierte Zellen zeigen kein solches Signal. Dass die Magenepithelzellen vital waren und das CagA-Protein tatsächlich in diese transloziert wurde zeigt die rechte Seite der Abbildung, der Phospho-Tyrosin-Blot an, da nur intrazelluläres CagA phosphoryliert wird, da wiederum dieser Vorgang an die Anwesenheit der intrazellulär gelegenen Protein-Tyrosin-Kinasen der c-src-Familie gekoppelt ist (Backert et al., 2001; Selbach et al., 2002; Püls et al., 2002; Stein et al., 2002).

Als Beispiel für Leukozyten wurde die gut etablierte humane Makrophagenzelllinie THP-1 verwendet. Auch diese Zellen wurden mit einer MOI von 100 für 4 h infiziert und anschließend einer Phosphotyrosinanalyse unterzogen (siehe Abbildung 12)

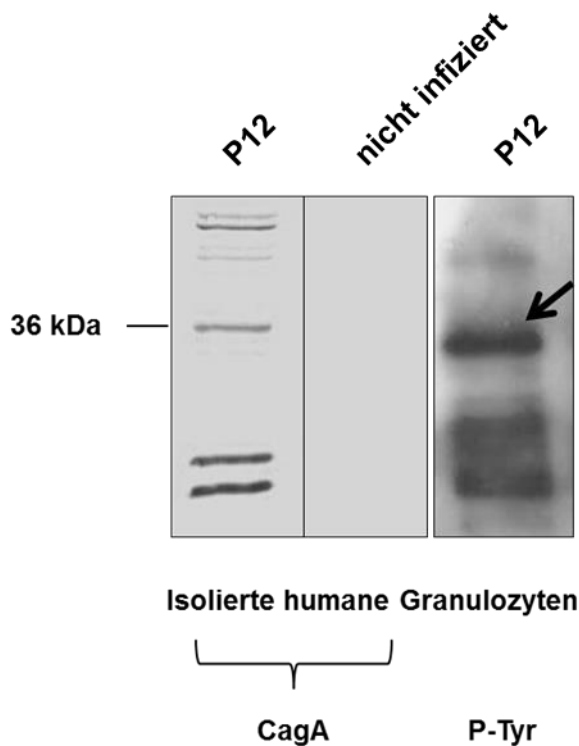


**Abbildung 12: Translokation und Prozessierung von CagA in der Makrophagenzelllinie (THP-1)**

THP-1-Zellen wurden mit dem *H. pylori*-Wildtypstamm P12 bei einer MOI von 100 für 4 h infiziert, oder uninfiziert belassen. Ganzzelllysate der entsprechenden Ansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen CagA (AK257, obere Zeile) bzw. einem Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosinreste (PY99, untere Zeile) entwickelt. Pfeilspitze zeigt das Tyrosin-phosphorylierte ca. 40 kDa große CagA Spaltprodukt an.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, kann nach der Infektion im CagA-Western Blot das Volllängenprotein bei 135 kDa detektiert werden, jedoch taucht außerdem bei ca. 40 kDa ein CagA-Spaltprodukt auf, welches ein positives Ergebnis im Phospho-Tyrosin-Blot zeigt (Pfeilspitze). Die Beobachtung, dass kein phosphoryliertes Volllängenprodukt zu sehen ist, deutet darauf hin, dass in die THP-1-Zellen transloziertes CagA-Protein dort zum überwiegenden Teil prozessiert wurde. Wenige residuelle Mengen an Volllängen-CagA könnten aus noch adhärenen Bakterien stammen.

Um sich der physiologischen Situation in den in-vitro Experimenten möglichst anzunähern, wurde die CagA-Translokation zusätzlich in frisch isolierten humanen Granulozyten untersucht. Diese wurden aus Vollblut mittels Dichtegradienten isoliert und nach zusätzlich durchgeführter Erythrozytenlyse und Aufreinigung eingesetzt. Zur Infektion wurden hierbei  $1,2 \times 10^6$  Granulozyten mit einer MOI von 100 für 4 h inkubiert. Dass es sich hierbei tatsächlich um humane Granulozyten handelt, wurde mittels Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD16 und CD66abce via „fluoreszenz activated cell sorting“ (FACS) gezeigt (Daten hierzu siehe Kapitel 3 Ergebnisteil).



**Abbildung 13: Translokation und Prozessierung von CagA in isolierten humanen Granulozyten**

Aus Vollblut isolierte humane Granulozyten wurden mit dem *H. pylori*-Wildtypstamm P12 bei einer MOI von 100 für 4 h infiziert, oder uninfiziert belassen. Ganzzelllysate der entsprechenden Ansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen CagA (AK257, obere Zeile) bzw. einem Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosinreste (PY99, untere Zeile) entwickelt. Hierbei nur ausgewählte Bildausschnitte gezeigt. Pfeil zeigt das Tyrosin-phosphorylierte ca. 35 kDa große CagA Spaltprodukt an.

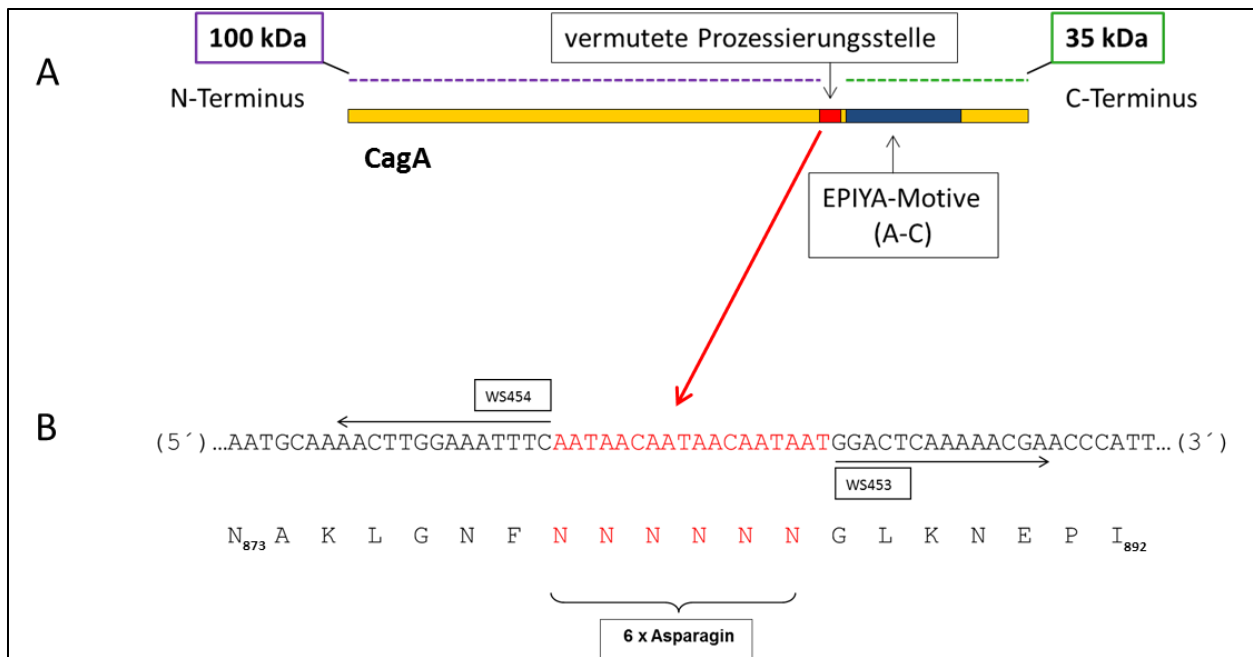
Abbildung 13 zeigt analog zu der Phagozytenzelllinie THP-1 auch bei isolierten humanen Granulozyten eine Spaltung des CagA-Proteins, wobei das ca. 35 kDa große Fragment wiederum in einem Phospho-Tyrosin-Blot nachgewiesen werden kann (siehe Pfeil).

Die Experimente zeigen dass CagA in alle untersuchten Zellen (Magenepithelzelllinie, Phagozytenzelllinie und humane isolierte Granulozyten) transloziert und auch in allen tyrosinphosphoryliert wird, wobei in Leukozyten, genauer in der THP-1-Zelllinie und in aus humanem Blut isolierten Granulozyten zusätzlich eine Prozessierung des Effektorproteins CagA stattfindet, welche bei der Magenepithelzelllinie AGS nicht zu beobachten ist, was die zuvor beschriebenen Ergebnisse (Odenbreit et. al, 2001) bestätigt.

## 2 Untersuchung der Prozessierungsstelle von CagA

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass CagA aus mehreren funktionellen Domänen aufgebaut ist. Mittlerweile existiert auch die Kristallstruktur des CagA-Proteins, genauer gesagt der größeren, 100 kDa umfassenden Domäne (Kaplan-Türköz und Terradot, 2013; Hayashi et al., 2012), die einen solchen Aufbau aus Domänen direkt zeigt. Der C-terminale Teil konnte bis jetzt strukturell nicht aufgelöst werden, sodass derzeit angenommen wird, dass dieser unstrukturiert („intrinsically disordered“) ist. Eine Spaltung in die beiden CagA-Fragmente konnte unter verschiedenen Bedingungen beobachtet werden. So wurde zum Beispiel beschrieben, dass rekombinant in *E. coli* produzierte CagA-Konstrukte unterschiedlicher Länge in Abhängigkeit von ihrer Größe prozessiert werden, wobei ein proteolytisch sehr stabiles Prozessierungsprodukt das gleiche Molekulargewicht wie das oben beschriebene 35 kDa-Fragment aufweist. Diesbezüglich durchgeführte Sekundärstruktur-Vorhersagen zeigen an dieser Stelle keine  $\alpha$ -Helix- oder  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, sondern einen „Loop“, was als zusätzlicher Hinweis auf eine an dieser Stelle befindliche Spaltung-determinierende-Stelle gesehen werden kann (Angelini et al., 2009).

Wir vermuteten aufgrund der Größe der Fragmente eine bestimmte Lokalisation der Spaltstelle. Diese müsste sich, entsprechend den Längenanalysen von Angelini *et al.*, kurz vor den EPIYA-Motiven im C-terminalen Bereich des CagA-Proteins, befinden. Um die Funktion der Prozessierungsstelle in Bezug auf die proteolytische Prozessierung und die Tyrosin-Phosphorylierung des CagA-Proteins näher zu charakterisieren, wurde versucht die entsprechende Stelle im *cagA*-Gen von *H. pylori* zu mutagenisieren.



**Abbildung 14: Skizze des CagA-Proteins mit Prozessierungsstelle und deren abgeleiteter Aminosäuresequenz**

**A)** Schematische Darstellung des CagA-Proteins mit den im C-terminalen Bereich gelegenen EPIYA-Motiven (blau) und der vermuteten Lokalisation der Prozessierungsstelle (rot). **B)** Codierende Basenabfolge der Prozessierungsstelle mit abgeleiteter Aminosäuresequenz, Nummerierung der ersten und letzten Aminosäure (tiefgestellt) und im Rahmen der Mutagenese verwendeten Primerpaar WS454 und WS453.

## 2.2 Herstellung der Deletionsmutante P12CagAΔN6

Zur Einführung veränderter *cagA*-Gene in *H. pylori* wurden bislang verschiedene Komplementationsverfahren verwendet, zum Beispiel eine Komplementation mit *cagA* auf dem Shuttle-Vektor pHel2 (Hohlfeld et al., 2006), oder eine Einführung des mutierten *cagA*-Gens in den chromosomalen *recA*-Locus einer *cagA*-Deletionsmutante (Püls et al., 2002).

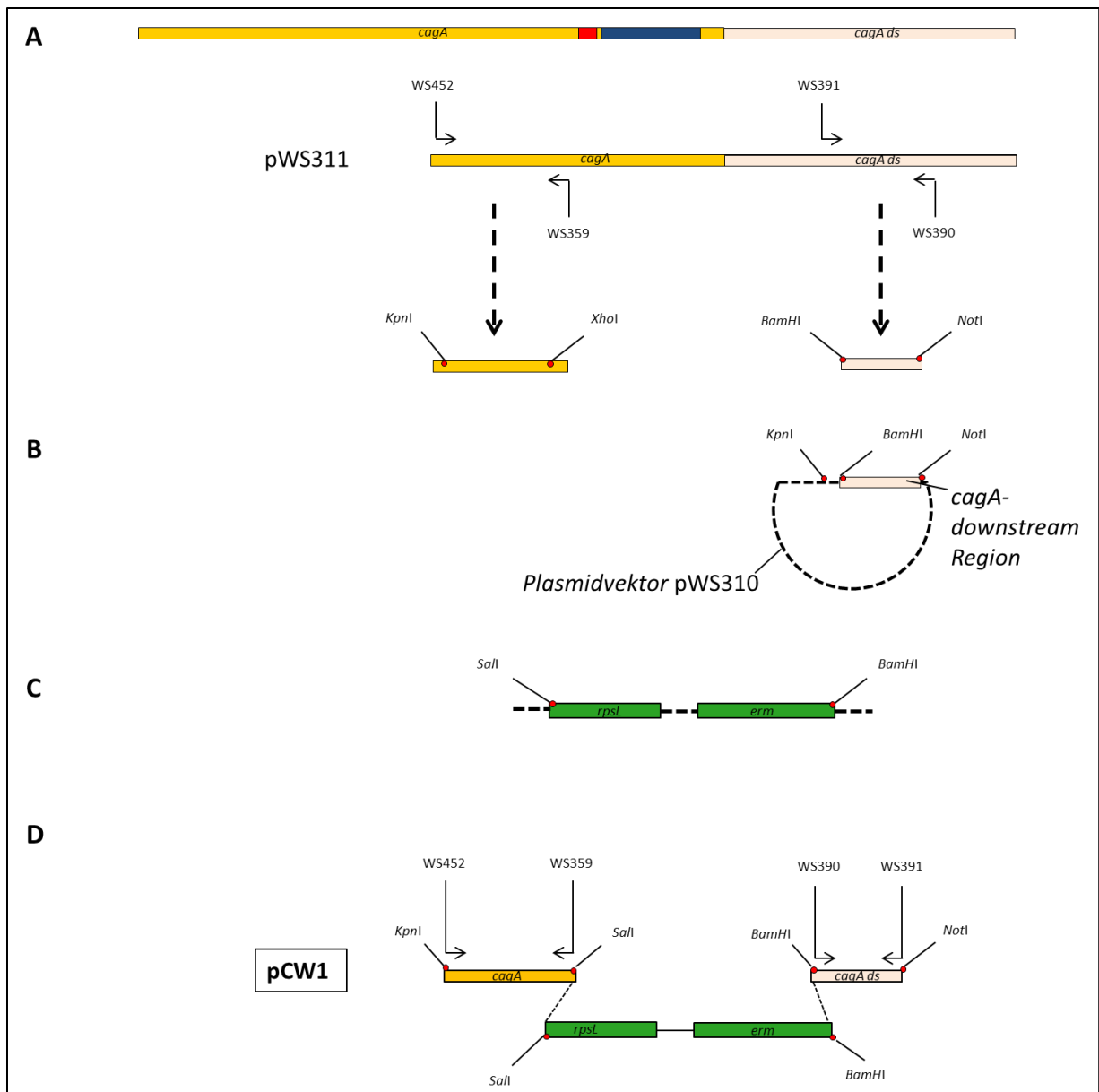
Auf Grund der teils schlechten Expression der auf diese Weise eingeführten Gene wurde hier ein neues, chromosomales Komplementationsverfahren angewendet, bei dem zunächst der 3'-Anteil des *cagA*-Gens deletiert und durch eine *rpsL-erm*-Resistenzgen-Kassette ersetzt wird. In einem zweiten Schritt wurde das veränderte *cagA*-Gen mit einer anschließender stromabwärts befindlichen *cat*-Resistenzkassette wieder eingebaut, wodurch sich auf den Einbau von *cagA* mit Chloramphenicol selektionieren lässt. Durch diese Vorgehensweise wurden wegen des Einbaus im ursprünglichen *cagA*-Locus stabile und mit dem Wildtyp vergleichbare CagA-Proteinmengen erwartet.



Zur Herstellung des *cagA* 3'-Deletionsplasmids pCW1 wurde zunächst die 600 bp lange *cagA*-downstream Region des *H. pylori*-Wildtyp-Stammes P12 unter Verwendung der Primer WS390 und WS391 mittels PCR vervielfältigt (siehe Abbildung 15 A). In einem nächsten Schritt wurde dieses PCR-Produkt unter Zuhilfenahme der über die Primer angefügten *Bam*HI- und *Not*I-Restriktionsschnittstellen in den Bluescript II KS-Vektor ligiert (siehe Abb. 15 B).

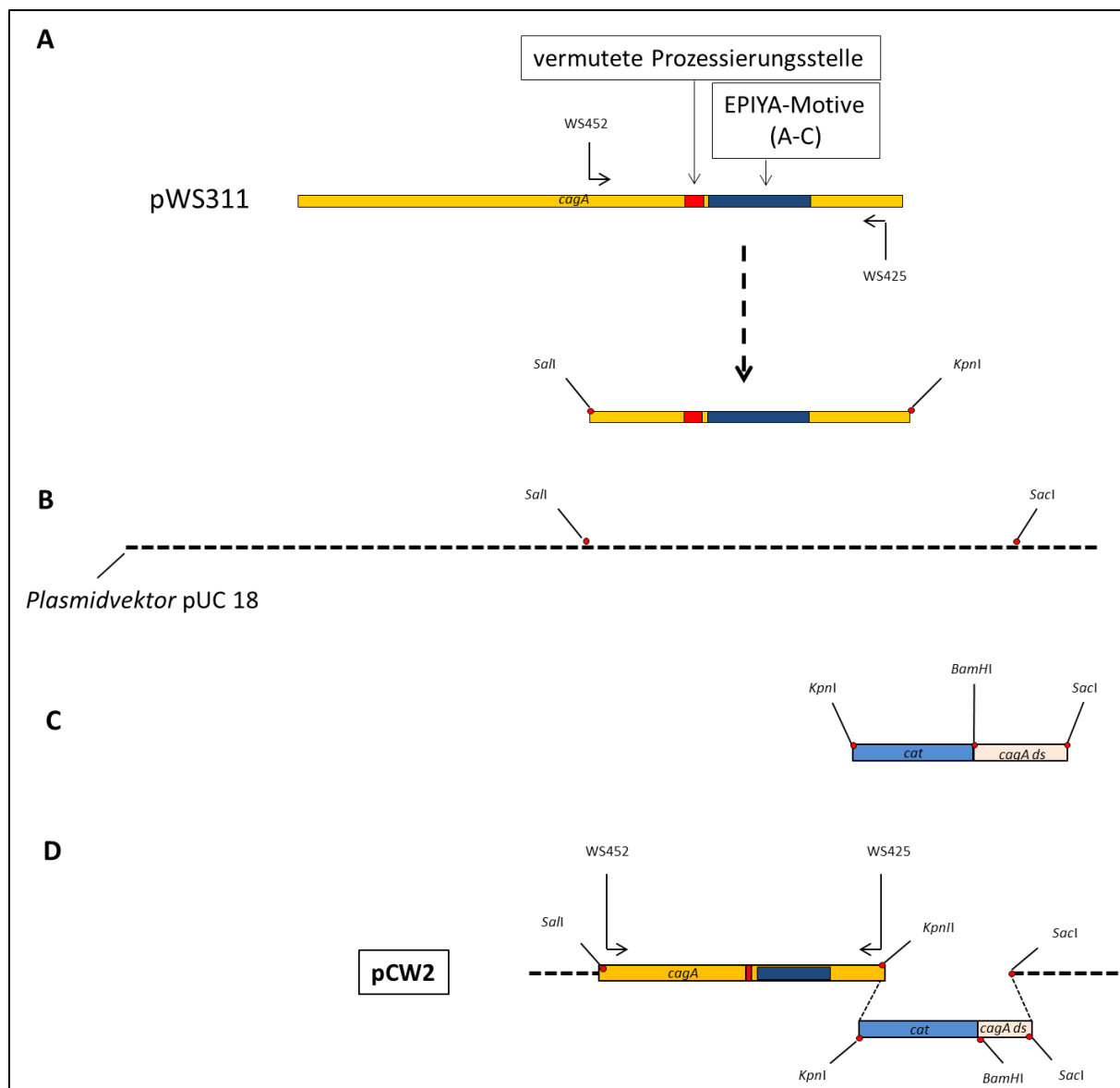
Das so erhaltene Zwischenkonstrukt wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *Kpn*I und *Bam*HI geschnitten und mit zwei weiteren DNA-Fragmenten ligiert, einem 500 bp langen Fragment des *cagA*-Gens (Codon 613-781), das mittels PCR mit den Primern WS452 und WS359 amplifiziert worden war (siehe Abb. 15 A), und mit einer *Sal*I/*Bam*HI geschnittenen *rpsL-erm*-Kassette (Fischer et al., 2010, siehe Abb. 15 C), woraufhin das Plasmid pCW1 (Abb. 15 D) entstand.

Durch Klonieren der *cagA* 3'-Region (Codon 613 bis 1214), welche mit den Primern WS452 und WS425 amplifiziert und mit *Sal*I und *Kpn*I geschnitten wurde (siehe Abb. 16 A), zusammen mit der *Kpn*I/*Sac*I geschnittenen *cat*-Kassette (Fischer et al., 2001, siehe Abb. 16 C) und einem *Bam*HI/*Sac*I geschnittenen Fragment stromabwärts von *cagA* in einen mit *Sal*I und *Sac*I geschnittenen pUC18-Plasmidvektor (siehe Abb. 16 B) wurde das Komplementationsplasmid pCW2 (siehe Abb. 16 D) hergestellt.



**Abbildung 15: Skizze der Herstellung des Plasmides pCW1**

**A)** Schematische Darstellung eines Anteils des *cagA*-Gens des *H. pylori*-Wildtyp-Stammes pWS311 (gelb) mit darauffolgender *cagA*-downstream-Region (bloss-orange) eingezeichneten verwendeten Primerpaaren WS452/359 und WS390/391 und den aus der PCR resultierenden Genfragmenten mit eingezeichneten Restriktionsenzymstellen sowie des darüberliegenden ganzen *cagA*-Gens mit rot-markierter vermuteter Prozessierungsstelle und blau-markierten EPIYA-Motiven. **B)** Ligationsprodukt bestehend aus Plasmidvektor pWS310 und WS390/391-amplifiziertem Genfragment mit eingezeichneten Restriktionsenzymstellen für *KpnI/BamHI* und *NotI*. **C)** Schematische Darstellung der *rpsL*-Erythromycin (*erm*)-Kassette (Fischer et al., 2010) mit eingezeichneten Restriktionsenzymstellen für *SalI* und *BamHI*. **D)** Schema des Plasmids pCW1, bestehend aus folgenden ligierten Untereinheiten: den mit den Primerpaaren WS452/359 und WS390/391 amplifizierten Genfragmente (siehe Abb. 15 A) und einer *SalI/BamHI* geschnittenen *rpsL*-*erm*-Kassette (Fischer et al., 2010, siehe Abb. 15 C).

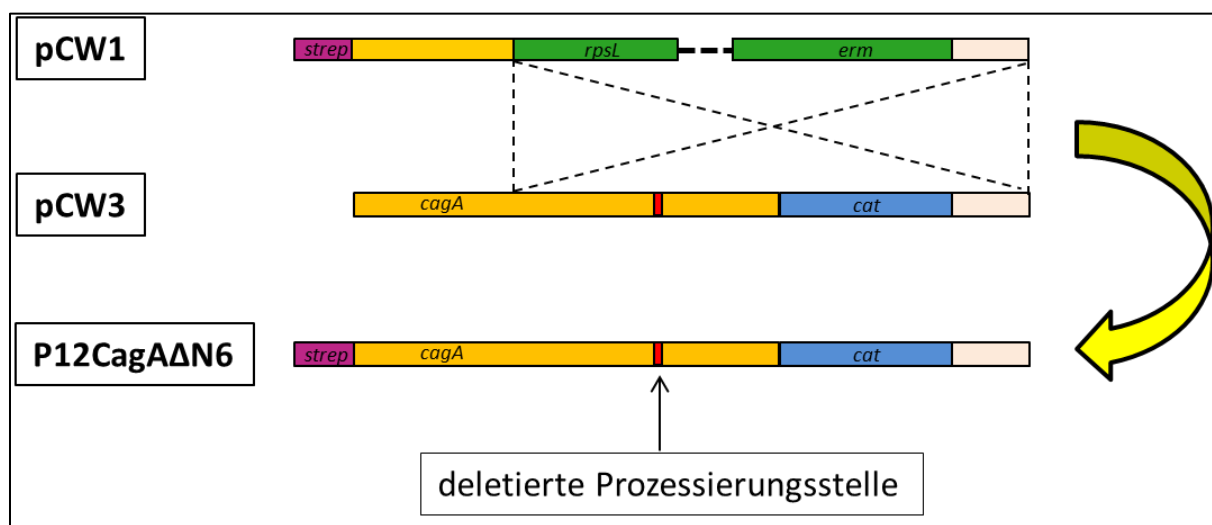


**Abbildung 16: Skizze der Herstellung des Plasmides pCW2**

**A)** Schematische Darstellung des *cagA*-Gens des *H. pylori*-Wildtyp-Stammes pWS311 mit hierin enthaltenen EPIYA-Motiven (blau) und vermuteter Prozessierungsstelle (rot), ferner mit eingezeichnetem verwendetem Primerpaar WS452/425 und WS390/391 und dem aus der PCR resultierendem Genfragmenten mit eingezeichneten Restriktionsenzymstellen *KpnI* und *SalI*. **B)** Schematische Darstellung des Plasmidvektors pUC18 mit darin enthaltenen Restriktionsenzymstellen für *SalI* und *SacI*. **C)** Schematische Darstellung der *Chloramphenicol* (*cat*)-Kassette (Fischer et al., 2001) mit eingezeichneten Restriktionsenzymstellen für *SalI* und *BamHI* und einem anhängendem die Restriktionsenzymstellen *BamHI* und *SacI* enthaltenem Genfragment stromabwärts von *cagA*. **D)** Schema des Plasmids pCW2, bestehend aus folgenden ligierten Untereinheiten: dem mit dem Primerpaar WS452/425 amplifizierem Genfragment (siehe Abb. 16 A) und einer *KpnI*/*SacI* geschnittenen *cat*-Kassette mit anhängendem stromabwärts von *cagA* befindlichem Genfragment (Fischer et al., 2010, siehe Abb. 16 C).

Um die sechs Asparaginreste der mutmaßlichen Prozessierungsstelle zu entfernen, wurde eine inverse PCR mit dem Plasmid pCW2 als Matrize durchgeführt. Hierzu wurden die Primer WS453 und WS454 verwendet. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit *DpnI* verdaut, um

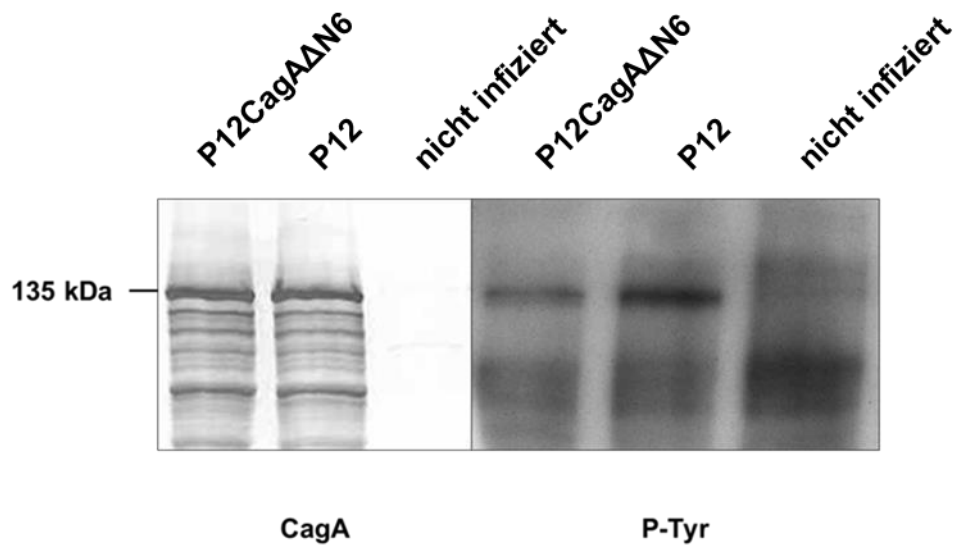
die methylierte Template-DNA (pCW2 mit noch unverändert enthaltener Prozessierungsstelle) zu beseitigen, mit *Pfu*-Polymerase inkubiert, um die Enden des PCR-Produktes zu glätten, sowie einer Ligation unterzogen, um wieder ein zirkuläres Plasmid zu erhalten. Die korrekte Deletion der mutmaßlichen Prozessierungsstelle wurde mittels Sequenzierung überprüft. Im Folgenden wurde zunächst pCW1 in *H. pylori* P12 (Strep) transformiert. Das so erhaltene Plasmid pCW3, wurde via Elektroporation in P12[pCW1] transformiert (siehe Abb. 17). Hieraus resultierte die Mutante P12CagAΔN6, welche nunmehr Chloramphenicol-resistent war und bei welcher die Prozessierungsstelle (sechs Asparaginreste) innerhalb des *cagA*-Gens deletiert und durch einen Serinrest ersetzt war.



**Abbildung 17:** Schematische Darstellung des finalen Transformationsprozesses mit resultierendem Mutationsstamm P12CagAΔN6

Rekombination des Plasmids pCW3 in P12 [pCW1] und der daraus resultierende *H. pylori*-Mutationsstamm P12CagAΔN6 mit deletierter Prozessierungsstelle.

Um nach der erfolgten Herstellung der P12CagAΔN6-Mutante zu überprüfen, wie sich der Stamm im Western-Blot gegenüber einem *H. pylori*-Wildtyp-Stamm verhält, wurde wie in Abbildung 18 gezeigt ein Western-Blot mit infizierten (*H. pylori*-P12-Wildtyp-Stamm und *H. pylori*-P12CagAΔN6-Deletionsmutante) und uninfizierten Magenepithelzellen (AGS-Zelllinie) durchgeführt. Hierbei erkennt man, dass CagA von der *H. pylori* P12CagAΔN6 Deletionsmutante in etwa vergleichbaren Mengen wie bei dem *H. pylori*-Wildtyp-Stamm produziert, und auch transloziert und tyrosinphosphoryliert wird.



**Abbildung 18: Translokation von Wildtyp-CagA und CagAΔN6 in die Magenepithelzelllinie (AGS)**

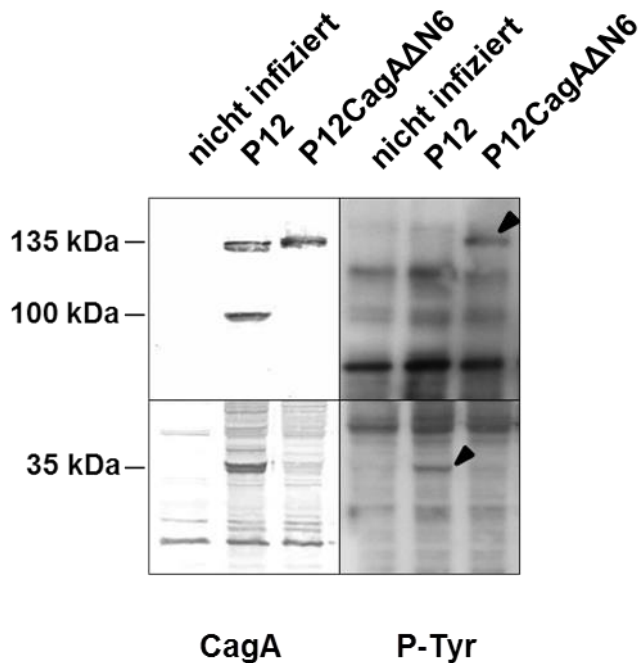
Links zeigt sich eine vergleichbare an Translokationsprodukt des Cag A der Deletionsmutante P12CagAΔN6 im versus dem *H. pylori*-Wildtyp-Stamm P12. Rechts zeigt sich, dass im Falle beider *H. pylori*-Stämme auch eine Tyrosin-Phosphorylierung des ca.135 kDa großen Fragments stattfindet.

### 2.3 Untersuchungen zur Funktion der Prozessierungsstelle in Bezug auf die Translokation und Phosphorylierung des CagA-Proteins in Phagozytenzelllinien

Nach erfolgreicher Herstellung der *H. pylori* P12CagAΔN6 Deletionsmutante, wurde diese nun im Vergleich zu einem *H. pylori*-P12-Wildtyp-Stamm in Western-Blot-Experimenten mit Phagozytenzelllinien eingesetzt, zur Klärung, ob die Prozessierung des CagA-Proteins und seine Phosphorylierung, voneinander abhängige intrazelluläre Mechanismen darstellen. Dies konnte bis dato in Phagozytenzelllinien noch nicht nachgewiesen werden und stellt einen wichtigen Meilenstein auf dem Weg zum besseren Verständnis der Prozesse im Rahmen der *H. pylori*-Phagozyten-Interaktion dar. So ist es durchaus denkbar, dass die Prozessierungsfragmente einen Einfluss auf die Migration von Phagozyten haben, beispielsweise indem sie die Ausbildung von Zytoskelettfilamenten stören.

Abbildung 19 zeigt die Situation in einer infizierten Phagozytenzelllinie. Hier wird im Gegensatz zu den Epithelzellen, das CagA des Wildtyp *H. pylori*-Stammes P12 in ein 100 kDa- und ein 35 kDa-Fragment prozessiert, und das 35 kDa-Fragment mit den enthaltenen EPIYA-Motiven auch tyrosinphosphoryliert (untere Pfeilspitze). Das CagA-Protein der Mutante P12CagAΔN6 wird dagegen nicht mehr prozessiert. Vielmehr ist hier nur das 135 kDa-Volllängenprotein sichtbar. Dieses ungespaltene 135 kD große CagA-Volllängenprotein

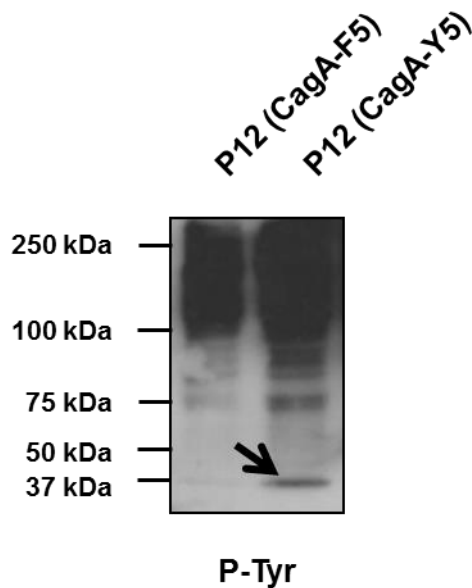
wird jedoch immer noch tyrosinphosphoryliert (obere Pfeilspitze), was zeigt, dass die Phosphorylierung des CagA-Proteins nicht von der Spaltung abhängig ist.



**Abbildung 19: Translokation und Prozessierung von Wildtyp-CagA und Deletionsmutanten-CagA in der Phagozytenzelllinie (J774)**

Das CagA-Protein des Mutationsstammes P12CagAΔN6 wird im Gegensatz zum Wildtyp-CagA nicht prozessiert. Im Phospho-Tyrosin-Blot ist daher nur eine Bande im Bereich von ca. 135 kDa zu sehen (obere Pfeilspitze). Die untere Pfeilspitze deutet auf das prozessierte Wildtyp-CagA bei ca. 35 kDa. Linke Seite: CagA beider Stämme wird transloziert.

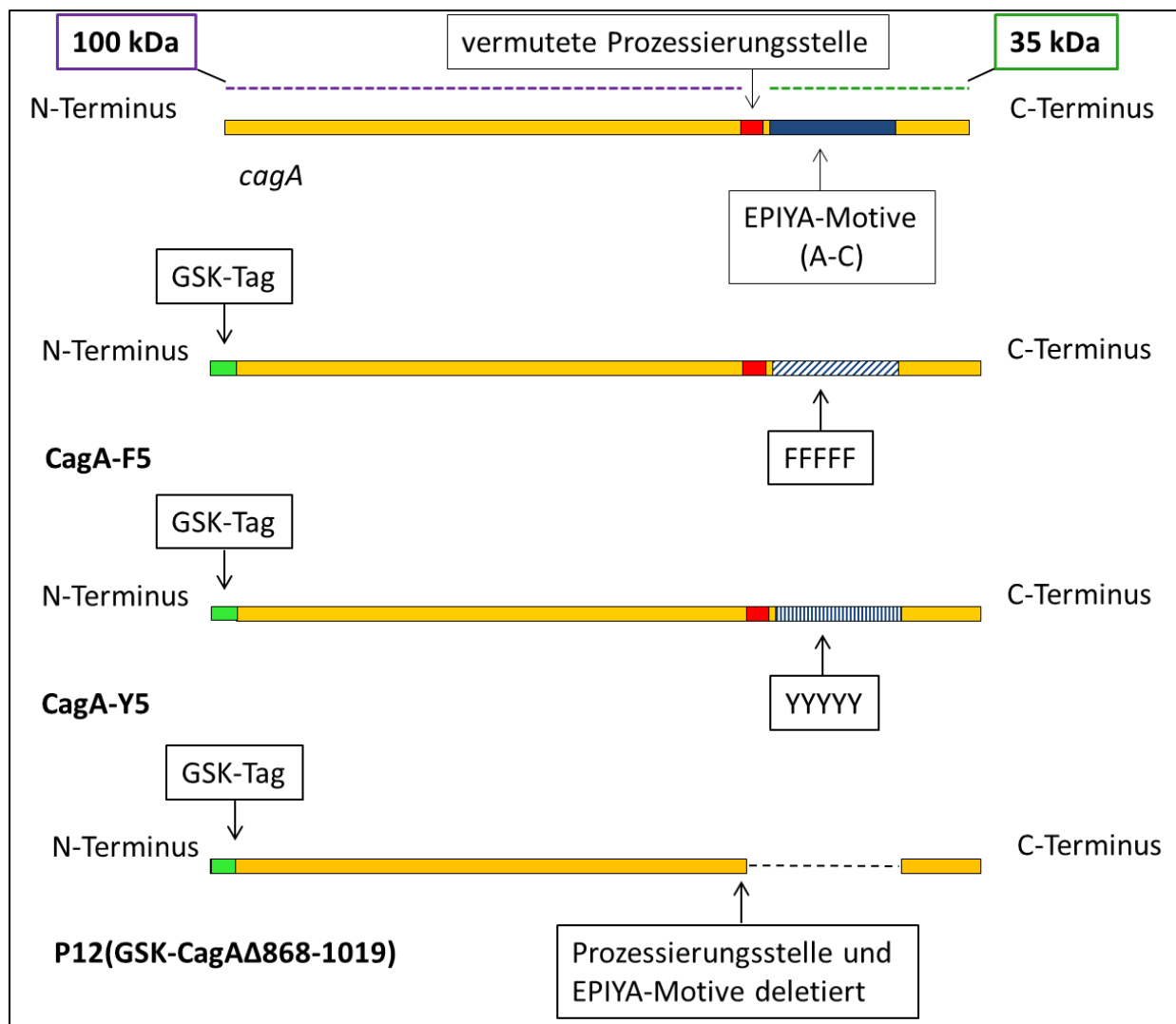
Um zu klären, ob die proteolytische Prozessierung unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung ist, wurden die Mutanten P12(CagA-Y5) und P12 (CagA-F5) verwendet. Hierbei handelt es sich um Stämme, die hybride CagA-Proteine (aus den *cagA*-Genen der Stämme P12 und NCTC11637) mit entweder insgesamt fünf EPIYA-Motiven [P12 (CagA-Y5)] bzw. mit fünf EPIFA-Motiven, in denen alle phosphorylierbaren Tyrosinreste durch Phenylalaninreste ersetzt sind [P12(CagA-F5)], produzieren. Somit kann das CagA-F5-Protein nicht mehr Tyrosin-phosphoryliert werden (siehe Abb. 20).



**Abbildung 20: Prozessierung von Wildtyp-CagA und Deletionsmutanten-CagA in der Phagozytenzelllinie (J774)**

Zellen der Phagozytenzelllinie J774 wurden mit den *H. pylori* Mutationsstämmen P12(CagA-Y5) und P12(CagA-F5) infiziert und 4 h inkubiert. Anschließend wurde ein Tyrosin-Phosphorylierungs-Western-Blot durchgeführt, wobei ein prozessiertes und Tyrosin-phosphoryliertes in etwa 35 kDa großes Fragment bei dem Stamm P12(CagA-Y5) zu sehen ist (Pfeil), welches bei dem Stamm P12(CagA-F5) fehlt.

Zusätzlich wurde in beiden Mutanten das *cagA*-Gen so verändert, dass sich am N-Terminus des CagA-Proteins ein „glycogen synthase kinase (GSK)-Tag“ befindet. Dieser Tag ist ein von der CagA-Phosphorylierung unabhängiges Reportersystem zur Detektion der CagA-Translokation, die über den Nachweis der Phosphorylierung des GSK-Tags, welche ebenfalls nur in der eukaryontischen Zelle stattfindet, angezeigt wird (Hohlfeld et al., 2006). Das den GSK-Tag tragende CagA-Fragment kann somit in einem Phospho-GSK-Blot detektiert werden. Der *H. pylori*-Stamm P12(GSK-CagA $\Delta$ 868-1019) enthält ein *cagA*-Gen mit deletierter Prozessierungsstelle und komplett deletierten EPIYA-Motiven. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Stamm verwendet, der ein Wildtyp-CagA-Protein mit N-terminalem GSK-Tag produziert (pIP9). In der unten folgenden Abbildung 21 sind die beschriebenen *H. pylori*-Stämme in Bezug auf das jeweils vorhandene *cagA*-Gen graphisch dargestellt.



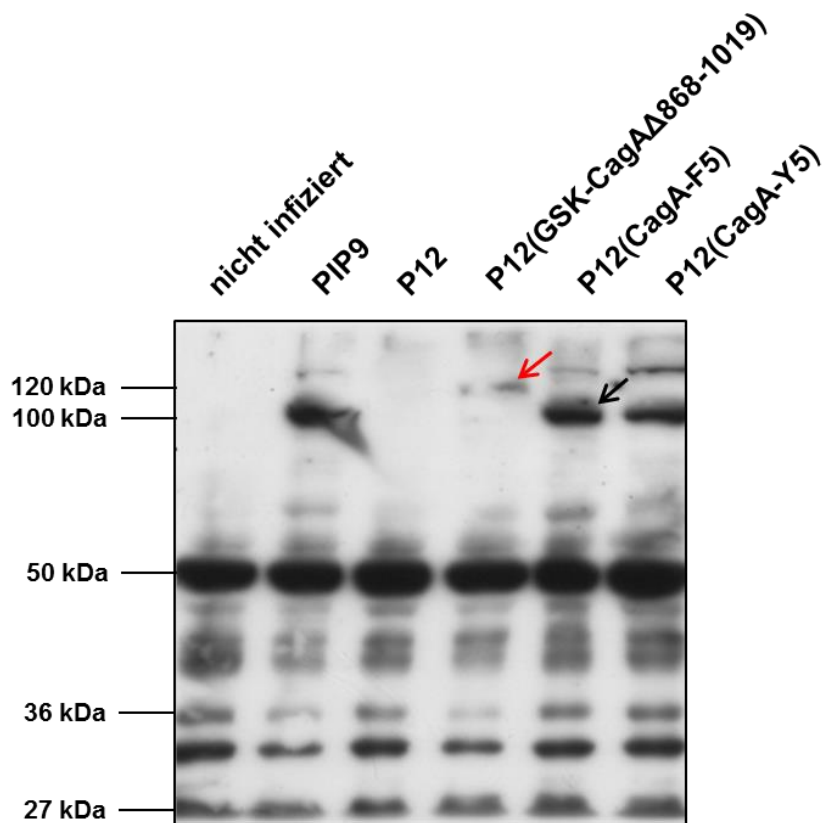
**Abbildung 21: Schematische Darstellung einiger CagA-Mutationsstämme**

in Bezug auf GSK-Tag (grün) am N-terminalen Ende, Prozessierungsstelle (rot) und EPIYA-Motiven (blau).

In Abbildung 22 zeigt sich die Situation in der Phagozytenzelllinie THP-1. Da der GSK-Tag am N-Terminus des CagA-Proteins lokalisiert ist, liefern in diesem Phospho-GSK-Blot nur das Volllängenprotein oder das N-terminale 100 kDa-Fragment ein Signal bei Translokation in die Zelle. Dies zeigt sich sowohl bei dem Kontroll-Stamm pIP9, als auch bei beiden Hybrid-CagA-Proteinen (Y5, F5), unabhängig von der Phosphorylierung. Ein 135 kD großes Volllängen CagA ist nicht zu sehen. Des Weiteren erkennt man, dass das CagA-Protein der Mutante P12(CagA-F5) proteolytisch prozessiert wird – angezeigt durch des schwarzen Pfeil, welcher das ca. 100 kDa schwere Fragment markiert - obwohl es, wie weiter oben in Abbildung 20 gezeigt, nicht tyrosinphosphoryliert werden kann. Somit ist die proteolytische Prozessierung unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung.



Ferner ist der *H. pylori*-Stamm P12(GSK-CagA $\Delta$ 868-1019) aufgetragen dessen *cagA* eine deletierte Prozessierungsstelle und deletierte EPIYA Motive aufweist. Passend dazu sieht man hier lediglich ein CagA, welches nicht ganz die gesamten 135 kDa, sondern ca. 120 kDa zeigt. Obwohl es also keine EPIYA-Motive hat und somit auch dort nicht Tyrosin-Phosphoryliert werden kann, wird es dennoch in die Zielzelle transloziert.



**Abbildung 22: Phospho-GSK-Western Blot der Phagozytenzelllinie (THP-1)**

nach Infektion mit verschiedenen CagA-Mutationsstämmen und Wildtyp-Stamm und Entwicklung des Blots mit einem phospho-GSK-Antikörper. Man erkennt deutlich, dass das CagA der Mutante P12(CagA-F5) proteolytisch prozessiert werden kann (schwarzer Pfeil), obwohl es, wie vorher gezeigt, nicht tyrosinphosphoryliert werden kann (siehe Abbildung 20). Des Weiteren ist in der vierten Spalte der *H. pylori*-Stamm P12(GSK-CagA $\Delta$ 868-1019) aufgetragen, dessen *cagA* eine deletierte Prozessierungsstelle und deletierte EPIYA Motive aufweist. Passend dazu sieht man hier ein unprozessiertes CagA, welches ca. 120 kDa zeigt.

## 2.4 Zeitliche Messungen im Rahmen von Translokations- und Phosphorylierungsexperimenten mit P12 und P12CagAΔN6

Im Folgenden wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt in denen ein zeitlicher Verlauf der Prozessierung abgebildet werden sollte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die CagA-Tyrosin-Phosphorylierung des *H. pylori*-Stammes P12, in der Phagozytenzelllinie THP-1 nach spätestens zwei Stunden stattfindet (siehe Abbildung 23). Unter den gleichen Bedingungen wird auch der *H. pylori*-Mutationsstamm P12CagAΔN6, Tyrosin-Phosphoryliert. Der Unterschied allerdings zeigt sich in den Prozessierungsbanden. Eine ca. 40 kDa große Bande ist bei dem WT Stamm P12 im Phosphotyrosinblot deutlich erkennbar, wohingegen diese bei der P12CagAΔN6 Deletionsmutante fehlt. Bei letzterem Stamm ist hingegen eine Bande im Bereich von ca. 120 kDa (Abbildung 24, roter Pfeil) zu sehen, was bedeutet, dass hier das CagA-Volllängenprotein vorliegt und dieses bei deletierter Prozessierungsstelle auch nicht mehr proteolytisch prozessiert wird. In isolierten humanen Granulozyten findet die proteolytische Prozessierung zeitgleich mit der Tyrosine-Phosphorylierung bereits nach 30 min statt, wobei sich die im Western-Blot abgebildete Bande hier aber im Verlauf der Infektion noch verstärkt.

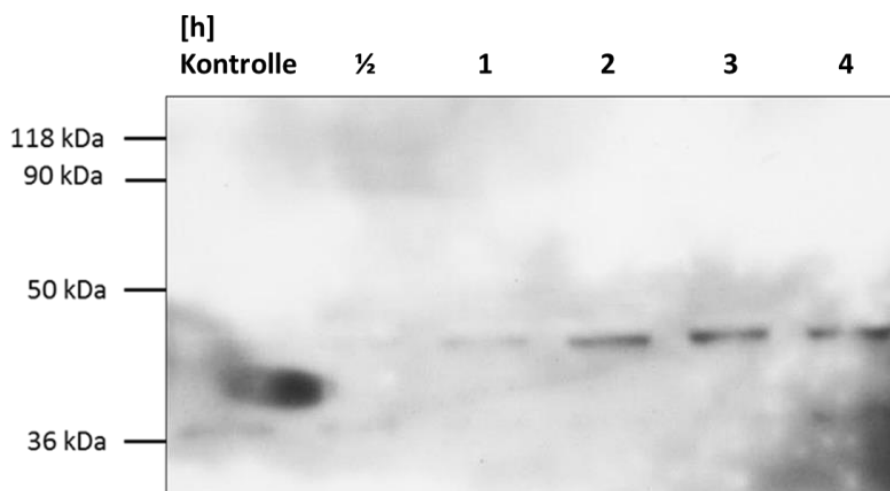
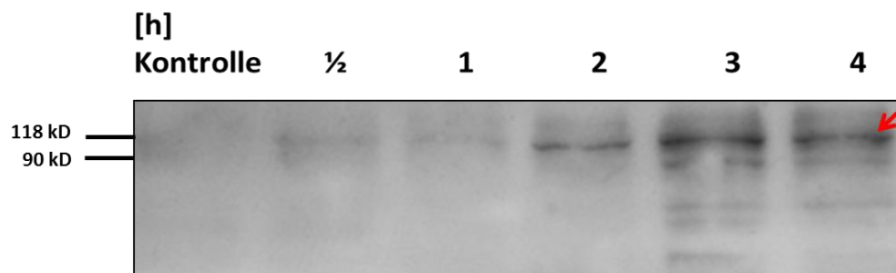


Abbildung 23: Prozessierung des *H. pylori*-Wildtyp-Stammes P12 in der Phagozytenzelllinie (THP-1)

Ein erster schwacher Nachweis des phosphorylierten CagA-Proteins ist schon nach einer halben bzw. nach einer Stunde sichtbar, ein deutlich sichtbarer Phosphorylierungs-Nachweis nach ca. zwei Stunden erkennbar.



**Abbildung 24: CagA-Phosphorylierung des *H. pylori*-Mutationsstammes P12CagAΔN6 in der Phagozytenzelllinie (THP-1)**

Ein erster schwacher Nachweis des phosphorylierten CagA-Proteins zeigt sich bereits nach einer halben bzw. nach einer Stunde, nach etwa zwei Stunden wird dieser zunehmend deutlich.

Des Weiteren bestätigen diese Blots die frühere Beobachtung, dass die Tyrosin-Phosphorylierung nicht von der proteolytischen Prozessierung des CagA-Proteins abhängig ist, denn es wird auch das ungespaltene Volllängenprotein der P12CagAΔN6 Deletionsmutante Tyrosin-Phosphoryliert.

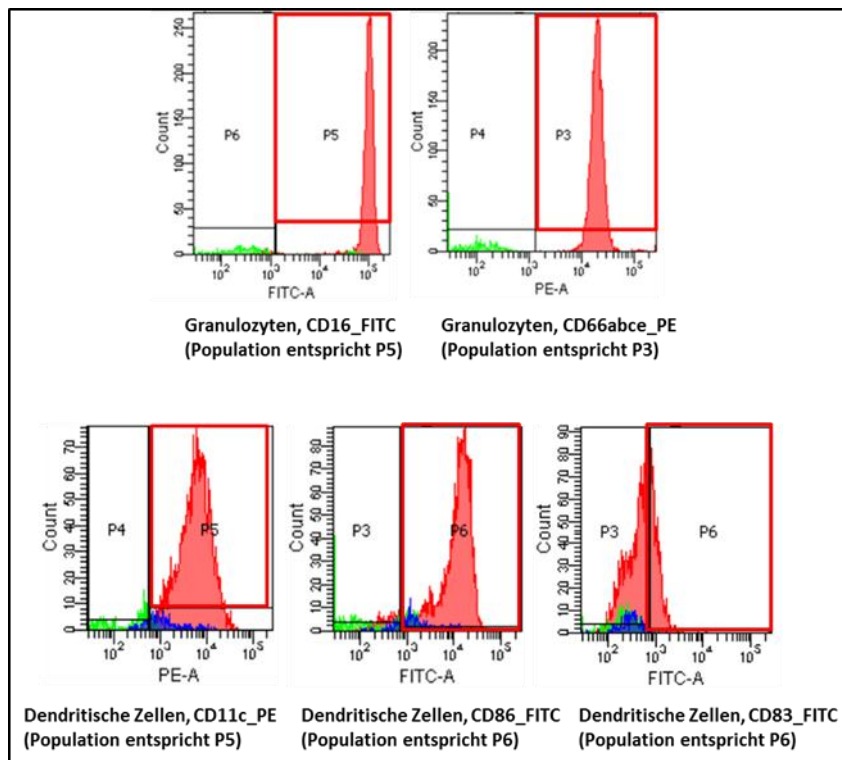
Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass das bakterielle Effektorprotein CagA über das Cag-T4SS, neben Phagozytenzelllinien, auch in frisch isolierte humane Granulozyten transloziert wird. Mit den Zeitexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine Translokation des CagA-Proteins in humanen Granulozyten und THP-1-Zellen in geringerem Ausmaß schon nach 30 Minuten, in sehr viel höherem Ausmaß nach ein und zwei Stunden, stattfindet. Des Weiteren führten die Experimente, unter anderem durch Verwendung der Prozessierungs-Mutante P12CagAΔN6, zu dem Ergebnis, dass die beiden Prozesse der proteolytischen Prozessierung und der Tyrosin-Phosphorylierung unabhängig voneinander sind.

### **3 Zellmigrationsexperimente**

#### **3.1 Boyden Chamber-Experimente**

##### **3.1.1 Vortestungen zur Etablierung der experimentellen Bedingungen und Einführung in die Boyden-Chamber Technik**

Zunächst wurden Migrationsexperimente mit verschiedenen Zellen und Chemoattraktanskonzentrationen durchgeführt, um das beste Modell zu etablieren. Pro Zelltyp wurden mindestens zwei Experimente bezüglich des Chemokins, bzw. verschiedenen Chemokinkonzentrationen durchgeführt. Als Zellen wurden hierbei differenzierte HL60-Zellen sowie aus humanem Blut frisch isolierte Granulozyten und dendritische Zellen verwendet. Zur Isolierung der Zellen aus Humanblut wurde Vollblut mittels Dichtegradienten aufgetrennt. Die gewünschte Zelfraktion wurde separat weiter aufgereinigt. Um dendritische Zellen zu gewinnen wurden Monozyten aus Vollblut isoliert und diese nach Gradientenauftrennung und Reinigungsschritten mit Hilfe von GM-CSF (granulocytes monocytes-colony stimulating factor) und IL-4 (Interleukin 4) innerhalb von sieben Tagen zu muren dendritischen Zellen differenziert. Zur Evaluierung der Isolierungsmethode wurden die isolierten Zellen per Durchflusszytometrie mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker von Granulozyten bzw. dendritischen Zellen charakterisiert.



**Abbildung 25: Zellcharakterisation mittels Oberflächenantikörper in der Durchflusszytometrie**

Verwendet wurden für Granulozyten die beiden Oberflächenprotein-Antikörper CD16 und CD66abce und für Dendritische Zellen die Oberflächenprotein-Antikörper CD11c, CD86 und CD83, letzterer zeigt das Vorhandensein von reifen/maturierten Dendritischen Zellen an.

**Tabelle 18: Isolierte Zelluntergruppen mit den jeweiligen Antikörpermarkierungen und dem prozentualen Anteil der Zellpopulation an der Gesamtzellanzahl**

Zellen	Antikörper-Markierung	Anteil an insgesamt isolierten Zellen [%]
Granulozyten	CD16_FITC	91,0
Granulozyten	CD66abce_PE	93,0
Dendritische Zellen	CD11c_PE	85,4
Dendritische Zellen	CD86_FITC	77,4
Dendritische Zellen	CD83_FITC	24,6

Eine der gut etablierten Methoden zur Analyse von Zellmigration und Chemotaxis ist die Boyden Chamber, eine im Jahr 1962 erstmals von Boyden beschriebene Zwei-Kammer-Technik, welche im unteren Bereich aus einer Wellplatte besteht (Boyden, 1962). Im oberen Bereich werden kleinere Körbchen (Inserts), deren Boden eine Membran mit definierter Porengröße darstellt, eingesetzt. Das untere Kompartiment ist mit Zellmedium gefüllt,

welches mit Chemoattraktans versetzt ist. Im Insert, also im oberen Kompartiment, befindet sich eine Suspension aus migrationsfähigen Zellen und Medium. Es entsteht ein chemischer Gradient, welchem die Zellen durch Migration folgen. Die im Vergleich zur Porengröße zumeist etwas größeren Zellen müssen sich aktiv verformen, um in das untere Kompartiment migrieren zu können, sodass die Boyden Chamber in diesem Ansatz eine Form der zwei- bis dreidimensionalen Migration darstellt. Verwendet wurden 24-Wellplatten und Inserts mit einer Porengröße von 3 µm. Als Lockstoff wurde fMLP, ein Stoffwechselnebenprodukt aus vier Aminosäuren welches in geringen Mengen auch von Bakterien selber produziert wird, in einer Konzentration von 100 nM verwendet, da Vorexperimente zeigten, dass fMLP ein besseres Chemoattraktans für neutrophile Granulozyten und differenzierte HL60-Zellen ist als beispielsweise IL-8 (Daten nicht gezeigt). Als Lockstoff für Dendritische Zellen wurde 5000 ng CCL19 verwendet. Die Zellzahl pro Insert betrug  $5 \times 10^5$  bei Granulozyten,  $1 \times 10^6$  bei differenzierten HL60-Zellen, außer sie war bei der Isolation dazu zu gering, was jedoch nur selten der Fall war und mindestens  $2 \times 10^4$  bei Dendritischen Zellen. Verschiedene *H. pylori*-Stämme von der Hälfte einer gut bewachsenen Serumplatte wurden geerntet und mit den Immunzellen in Suspension gebracht. Um die Zellen nicht zu beschädigen wurden, die Zell-, oder Zell-Bakterien-Suspension vorsichtig, nach Befüllung der unteren Kompartimente, in die Inserts pipettiert. Die Inkubation fand bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> statt. Anschließend wurde die Wellplatte mikroskopiert, um sich einen ersten Eindruck zu verschaffen, wie die Zellen migriert sind. Als nächstes wurden die Inserts vorsichtig aus den Wells entfernt und die Zellzahlen im unteren Kompartiment der Boyden-Chamber via FACS gezählt.

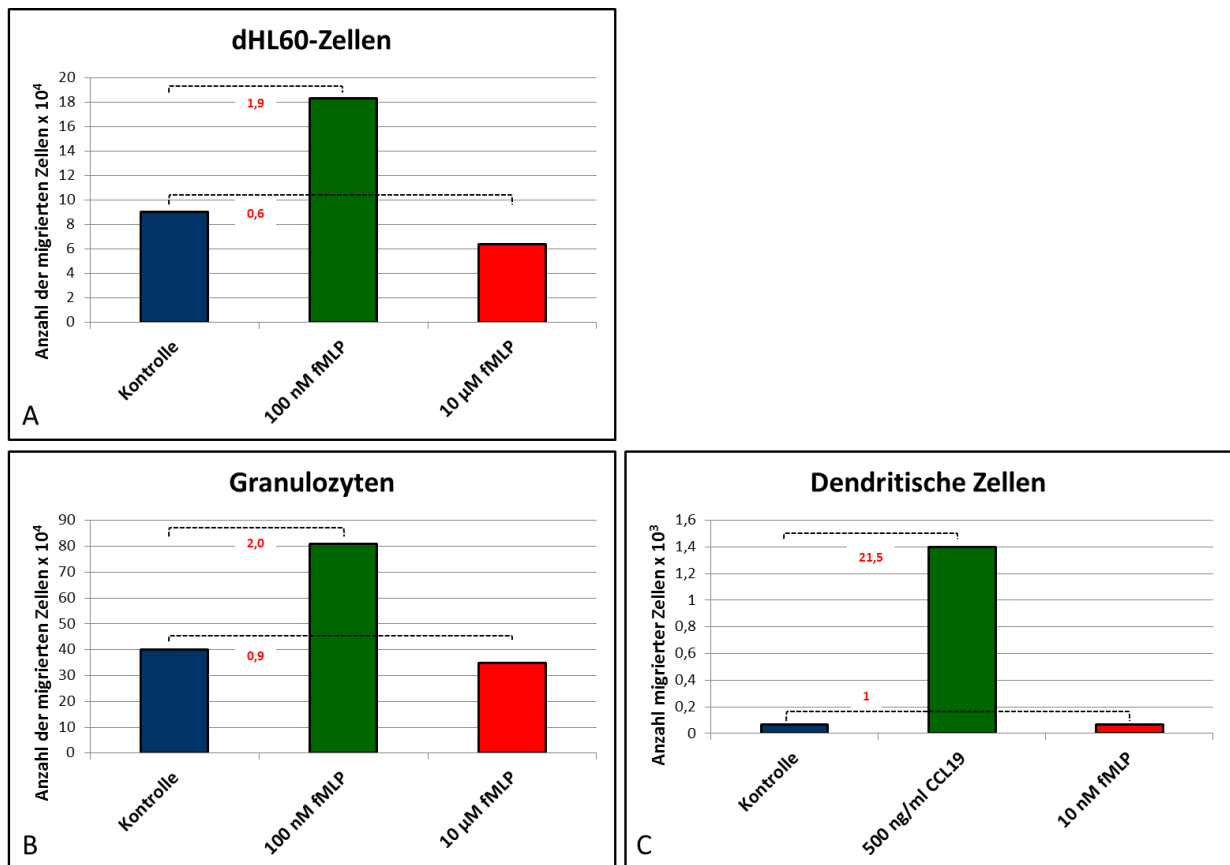
Mit diesem Modell soll die Migrationsfähigkeit von Leukozyten mittels Chemokinstimulus in An- oder Abwesenheit von *H. pylori* und insbesondere hierbei von verschiedenen Mutationsstämmen analysiert werden, um gegebenenfalls Rückschlüsse auf migrationshemmende Faktoren seitens *H. pylori* ziehen zu können.

Um die Migrationsfähigkeit der Zellen in einem absolutem Zahlenmaß besser darzustellen, wurde der Chemotaxisindex (nachfolgend als fett gedruckte rote Zahlen gekennzeichnet) wie folgt berechnet:

$$X = \frac{\text{Anzahl der migrierten Zellen in einem Ansatz mit Chemokin}}{\text{Anzahl der migrierten Zellen in einem Ansatz ohne Chemokin}}$$

<b>X = 1</b>	<b>keine Chemotaxis</b>
<b>X &gt; 1</b>	<b>Chemotaxis in Richtung des Chemokins (positive Chemotaxis)</b>
<b>X &lt; 1</b>	<b>Chemotaxis in entgegengesetzte Richtung des Chemokins (negative Chemotaxis)</b>

Betrachtet man innerhalb der Abbildung 26 die beiden fMLP-Konzentrationen bei den differenzierten HL60-Zellen und den isolierten Granulozyten so scheint eine Konzentration von 100 nM einen weitaus deutlicheren Migrationseffekt zu verursachen als eine Konzentration von 10  $\mu$ M. Die Verwendung von 100 nM fMLP zeigt einen deutlich positiven Chemotaxisindex von 1,9 (bei dHL60-Zellen, Abb. 10 A) und 2 (bei isol. Granulozyten, Abb. 10 B), verglichen zur Negativkontrolle, sodass hier von einer Chemotaxis in Richtung des Chemokins (positive Chemotaxis) gesprochen werden kann, wohingegen die 100-fache Konzentration die Zellen dazu veranlasst, nicht oder gar in deutlich geringerem Ausmaß, im Vergleich zu Ansätzen ganz ohne Chemokin, zu migrieren. Für die isolierten dendritischen Zellen wurde ein speziell von diesen Zellen erkanntes Chemokin, CCL19, getestet und mit fMLP (10 nM) verglichen. Eine Konzentration von 5000 ng/ml CCL19 zeigte einen ausgeprägt hohen positiven Chemotaxisindex von 21,5, im Vergleich zu einem Chemotaxisindex von 1 bei 10 nM fMLP (Abb. 26 C).



**Abbildung 26: Representative Säulendiagramme von Boyden-Chamber-Experimenten**

mit dHL60-Zellen (A, n=2), Granulozyten (B, n=2) und dendritischen Zellen (C, n=2) und je unterschiedlichen Chemokinkonzentrationen (100 nM oder 10 μM fMLP). Die MOI betrug je 20.

### 3.1.2 Boyden-Chamber-Experimente mit infizierten Zellen

Wie oben unter Kapitel 2.4 gezeigt werden konnte findet die CagA-Translokation spätestens nach zwei Stunden, aber auch schon nach ca. einer Stunde Infektionszeit in ausreichendem Maße statt. Somit wurde die Inkubationszeit von Bakterien mit den Zellen der nachfolgenden Experimente mit mindestens einer Stunde angesetzt. Die verschiedenen migrationsfähigen Immunzellen wurden mit unterschiedlichen cagPAI-Mutanten inkubiert um anschließend ihre Migrationsfähigkeit im Boyden-Chamber- oder im dreidimensionalen-Kollagengelansatz miteinander zu vergleichen.

In Abb. 27 bestätigt sich, dass es innerhalb von 30 min noch nicht zu einer ausreichenden intrazellulären Verarbeitung des Chemotaxis signals, geschweige denn zu einer hinreichenden Migration (Chemotaxisindex 0,7) kommt. Nach 1 h ist in diesem Experiment mit



differenzierten HL60-Zellen die Chemotaxis am effizientesten (Chemotaxisindex 1,6), nach 1,5 h ist die Chemotaxis immer noch hinreichend (Chemotaxisindex 1,2), jedoch nicht mehr in gleichem Maße effizient.

Betrachtet man jene Ergebnisse nach 1 h und 1,5 h so fällt auf, dass die  $\Delta$ PAI-infizierten Zellen effizienter migrieren als die Wildtyp-(P12)-infizierten Zellen.

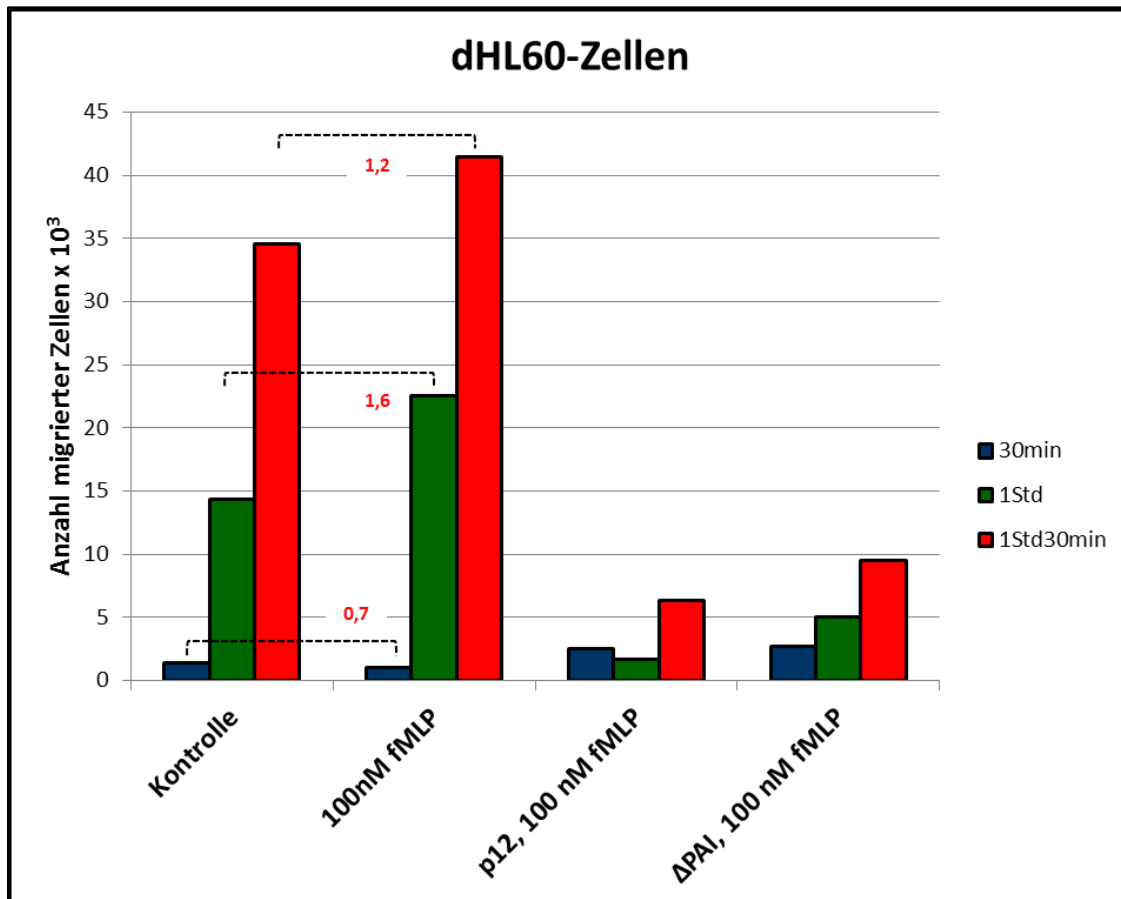
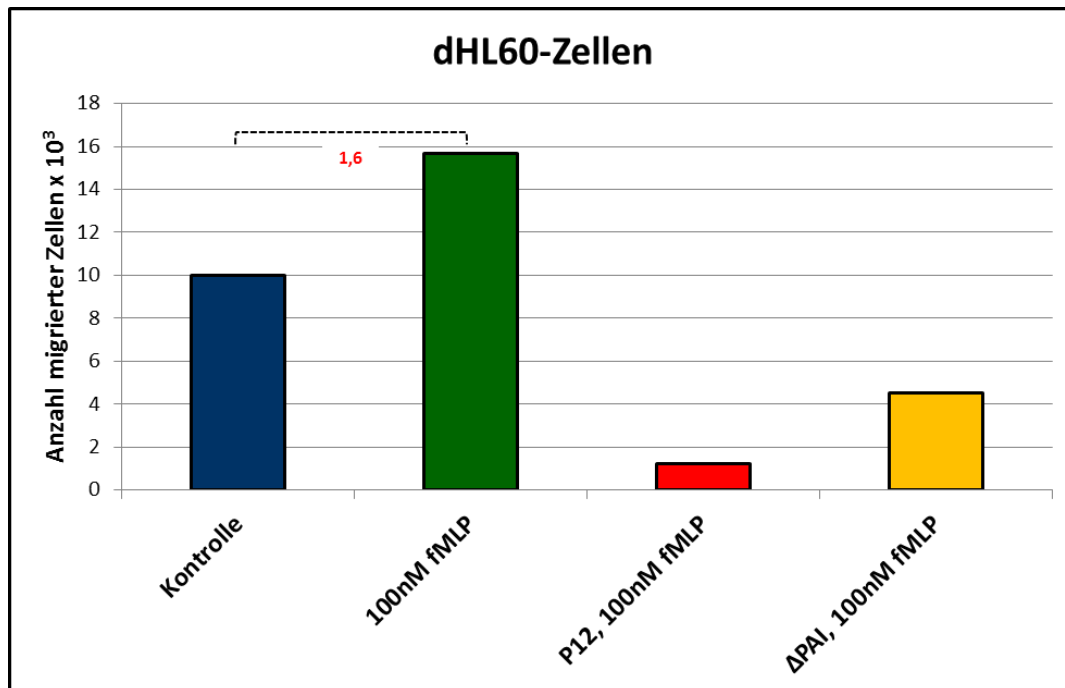


Abbildung 27: Representatives Säulendiagramm von Boyden-Chamber-Experimenten mit dHL60-Zellen und verschiedenen Inkubationszeiten. Die MOI betrug 20.

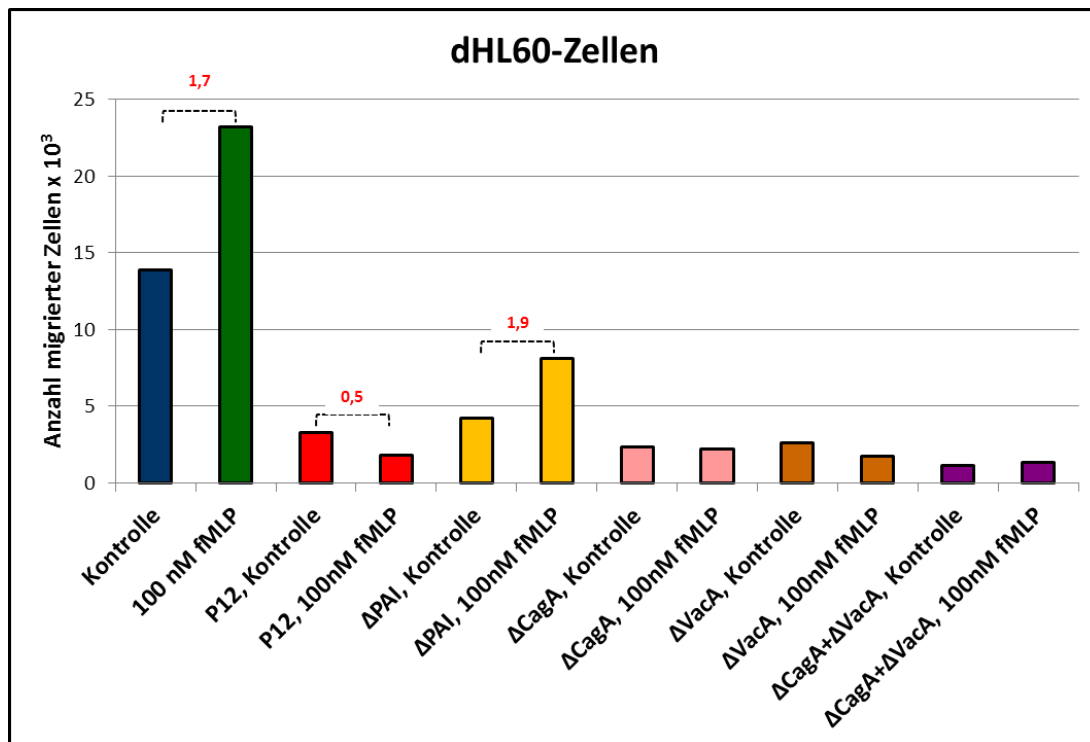
In weiteren Boyden-Chamber-Versuchen zeigte sich eine ähnliche Beobachtung, nämlich, dass, wie in Abb. 28 dargestellt, die mit *H. pylori*-Wildtyp-Stamm P12 infizierten Zellen (hier dHL60) eine schlechtere Migrationsfähigkeit aufweisen, als die mit dem *H. pylori*-Mutationsstamm  $\Delta$ PAI infizierten Zellen. Die *H. pylori*- $\Delta$ PAI-Mutante des Stammes P12 zeichnet sich durch ein Fehlen der gesamten *cag*-Pathogenitätsinsel mitsamt dem Typ-IV-Sekretionssystem sowie dem Effektorprotein CagA aus.



**Abbildung 28: Representatives Säulendiagramm von Boyden-Chamber-Experimenten**

mit dHL60-Zellen. Diese entweder nicht-infiziert oder mit *H. pylori*-Wildtyp-Stamm P12 oder dem Mutationsstamm ΔPAI infiziert. Die Dauer des Experiments betrug 1 h, die MOI 20.

Um auszuschließen, dass es sich bei der gesteigerten Migrationsfähigkeit um einen reinen Effekt des CagA-Effektorproteins handelt, wurden im folgenden Experimente mit einem ΔCagA-Mutationsstamm durchgeführt. Die Abb. 29 beinhaltet neben den schon in den vorigen Experimenten getesteten Faktoren unter anderem dHL60-Zellen, welche mit einem ΔCagA-Mutationsstamm infiziert sind. Diesem *H. pylori*-Stamm fehlt lediglich das CagA-Effektorprotein, das Typ-IV-Sekretionssystem und die übrigen Faktoren der *cag*-Pathogenitätsinsel sind erhalten. Abermals kann man hier beobachten, dass unter all den getesteten *H. pylori*-Mutationsstämmen der *H. pylori*-Mutationsstamm ΔPAI die geringste Migrationshemmung verursacht. Zellen, die mit dem ΔCagA-Mutationsstamm infiziert sind, wandern schlechter in Richtung Chemokinstimulus, was darauf hindeutet, dass zur Migrationshemmung kein alleiniger CagA-Effekt verantwortlich ist.



**Abbildung 29: Representatives Säulendiagramm von Boyden-Chamber-Experimenten**

mit dHL60-Zellen. Diese entweder nicht-infiziert oder mit *H. pylori*-Wildtyp-Stamm P12 oder verschiedenen Mutanten infiziert. Hierbei fand keine Vorinkubation statt. Die Dauer des Experiments betrug 1 ¾ h, die MOI 20.

Zur statistischen Absicherung wurden mehrere Experimente unter gleichen Bedingungen mit Granulozyten durchgeführt, hier zeigte sich reproduzierbar eine merkbar effizientere Migration bei ΔPAI-infizierten Zellen verglichen mit dem Rest der getesteten *H. pylori*-Stämme. Abb. 30 zeigt eine Auswertung von sechs Experimenten. Dabei waren die Migrationsunterschiede von Kontrolle mit und ohne fMLP, sowie die Migrationsunterschiede zwischen der Kontrolle mit Chemokinstimulus und den mit den getesteten *H. pylori*-Stämmen infizierten Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Migrationsunterschiede zwischen den einzelnen *H. pylori*-Stämmen waren nicht signifikant. Ebenso zur statistischen Beurteilbarkeit wurden Migrationsexperimente ohne Vorinkubation von Zellen mit Bakterien durchgeführt. Denn es ist vorstellbar, dass in vivo die Interaktion von Immunzellen und Bakterien, nach Zerstörung der mucosalen Zell-Zell-Kontakte, im Bereich des kollagenhaltigen Bindegewebes der gastralen Lamina propria in kurzer Zeit stattfindet.

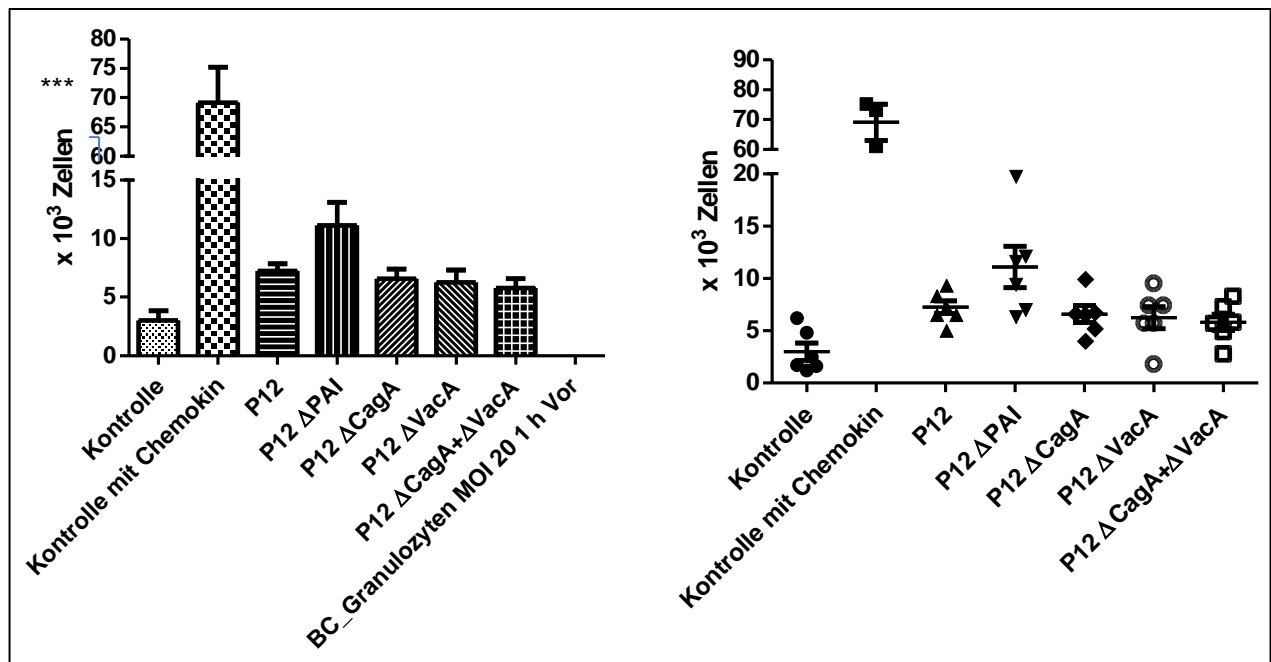


Abbildung 30: Zusammenstellung von Boyden-Chamber-Experimenten (n=6)

mit isolierten Granulozyten. Infektion mit Wildtyp-Stamm, verschiedenen Mutanten oder nicht-infiziert belassen. Hierbei eine Stunde Vorinkubation mit Bakterien. Die Dauer der Experimente betrug 1 h, die MOI 20.

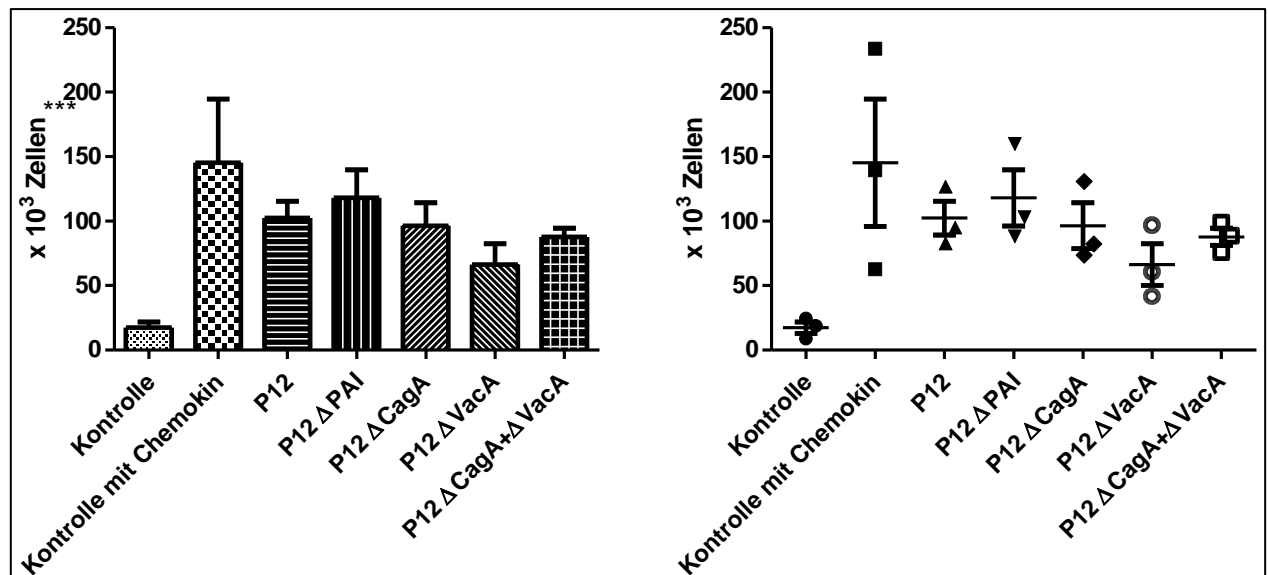
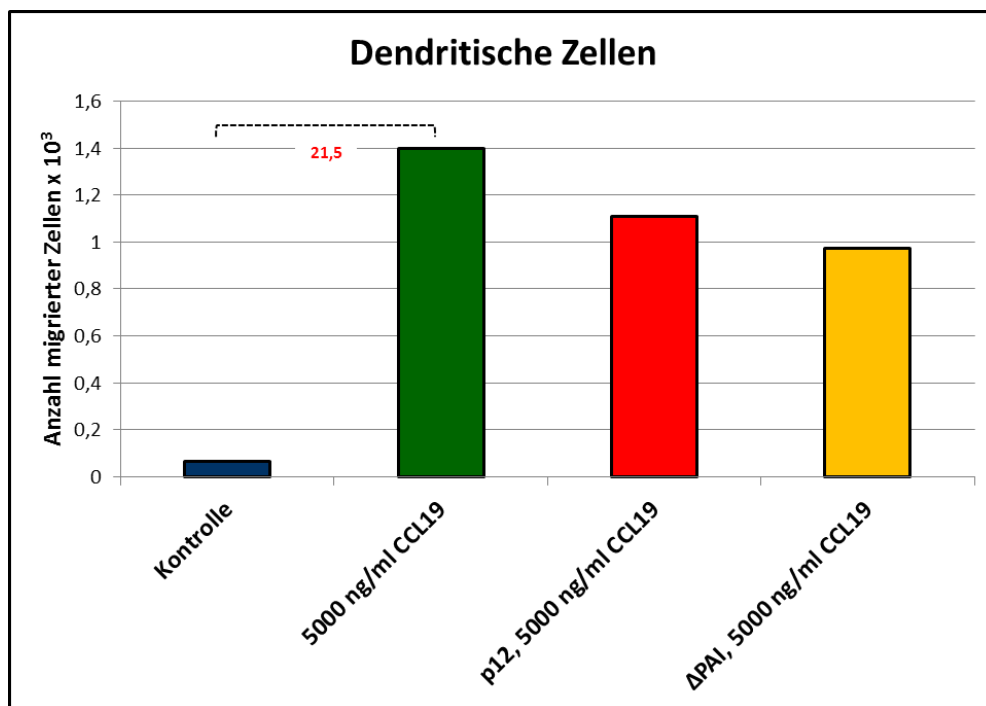


Abbildung 31: Zusammenstellung von Boyden-Chamber-Experimenten (n=3)

mit isolierten Granulozyten. Infektion mit Wildtyp-Stamm, verschiedenen Mutanten oder nicht-infiziert belassen. Hierbei keine Vorinkubation. Die Dauer der Experimente betrug 2 h, die MOI 1.

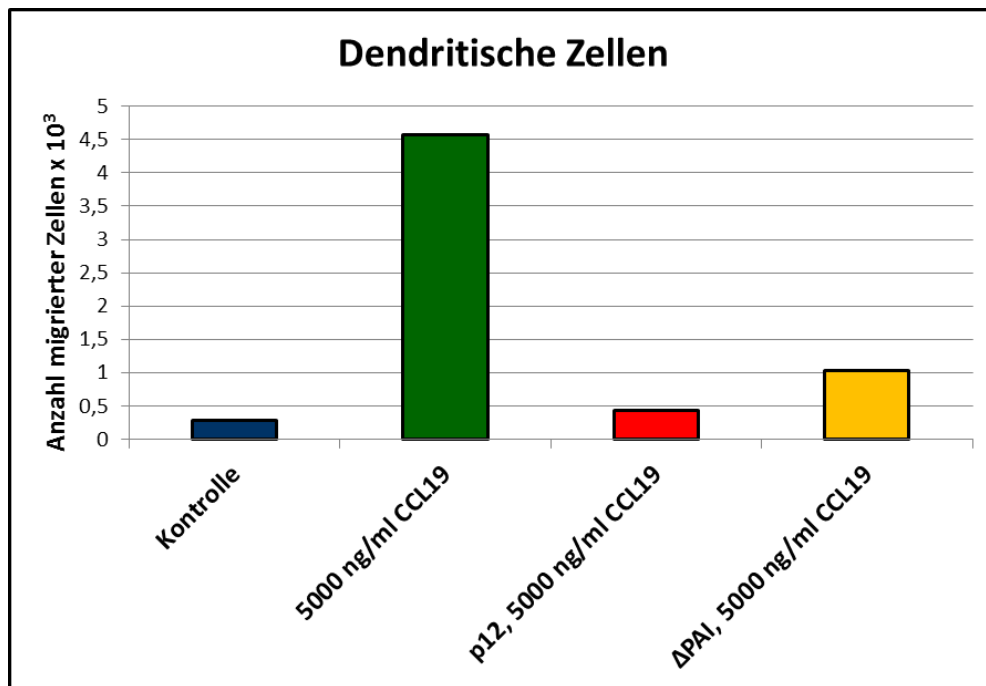
Abbildung 31 (Auswertung von drei Experimenten) zeigt wiederum die effizientere Migration der mit der  $\Delta$ PAI-Mutante infizierten gegenüber den mit Wildtyp-(P12)-infizierten Zellen, selbst wenn die Vorinkubation (Inkubation von Bakterien und Zellen, vor Beginn der Boyden-Chamber) fehlt. Auch in diesem Experiment war der Migrationsunterschied von Kontrolle mit und ohne fMLP signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Migrationsunterschiede zwischen den einzelnen *H. pylori*-Stämmen waren nicht signifikant.

Bei reifen dendritischen Zellen war der oben beschriebene Effekt nach drei h zu beobachten (siehe Abb. 33). Die  $\Delta$ PAI-infizierten dendritischen Zellen migrierten 2,4-mal so effizient wie die Wildtyp-(P12)-infizierten Zellen.



**Abbildung 32: Representatives Säulendiagramm von Boyden-Chamber-Experimenten (n2) mit Dendritischen Zellen**

Diese waren entweder nicht-infiziert oder mit *H. pylori*-Wildtyp-Stamm P12 oder dem Mutationsstamm  $\Delta$ PAI infiziert. Hierbei fand keine Vorinkubation statt. Die Dauer der Experimente betrug 1,5 h, die MOI 20.



**Abbildung 33: Representatives Säulendiagramm von Boyden-Chamber-Experimenten mit Dendritischen Zellen**

Diese waren entweder nicht-infiziert oder mit *H. pylori*-Wildtyp-Stamm P12 oder dem Mutationsstamm ΔPAI infiziert. Hierbei fand keine Vorinkubation statt. Die Dauer des Experimentes betrug 3 h, die MOI 20.

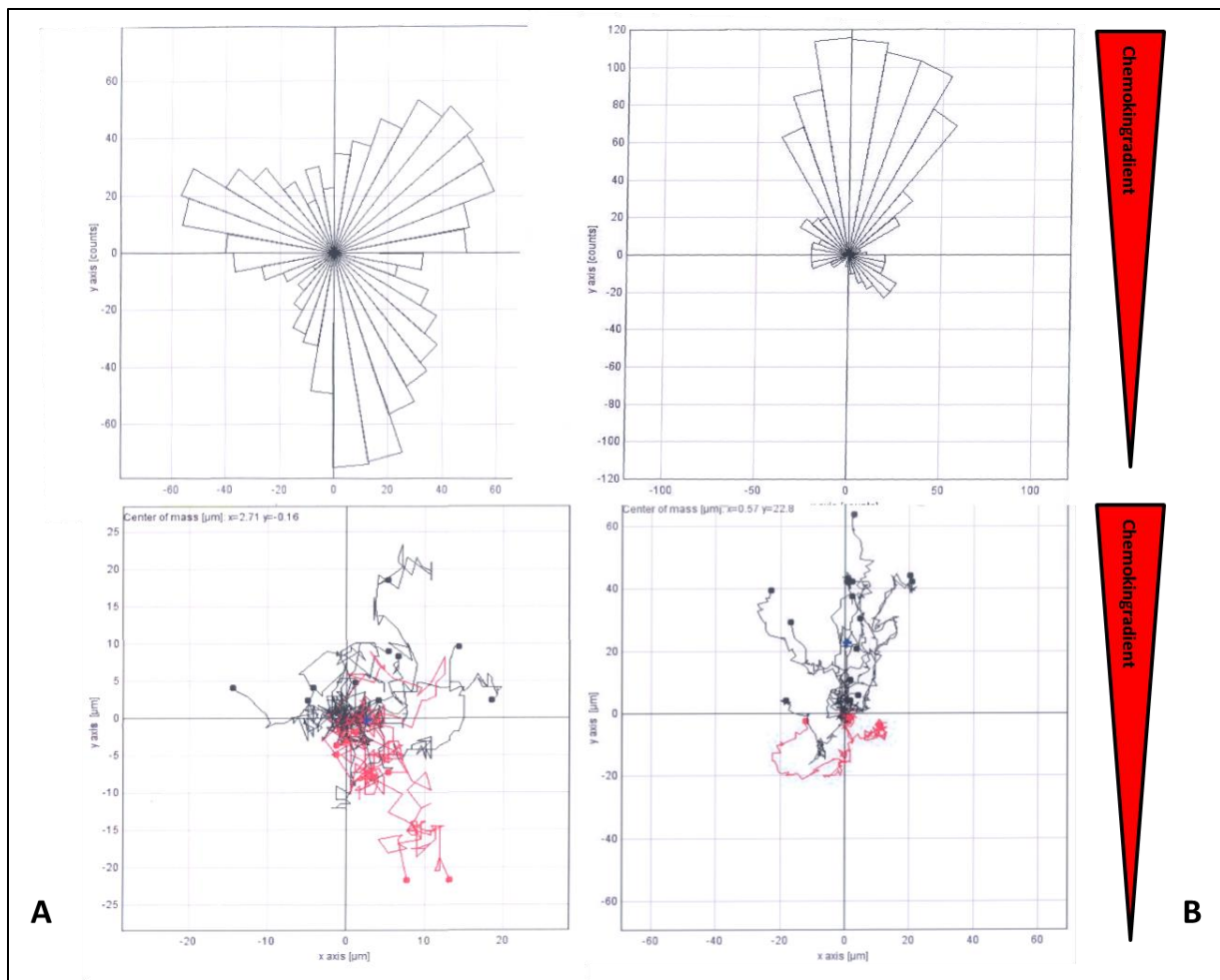
Die demonstrierten Ergebnisse zeigen somit klare Tendenzen, wonach ΔPAI-infizierte Zellen eine bessere Migrationsfähigkeit als jene mit Wildtyp (P12) oder anderen *H. pylori*-Mutanten infizierten Zellen aufweisen. Der ΔPAI-Mutante fehlt die ganze *cag*-Pathogenitätsinsel, und dementsprechend auch das *cag*-Typ4SS und das Effektorprotein CagA. Verglichen mit ΔCagA-infizierten (hier fehlt nur das Effektorprotein CagA) migrieren die ΔPAI-infizierten Zellen (dHL60 und isolierte Granulozyten) deutlich besser.

### 3.2 Kollagengel-Experimente

Kollagen, als ein natürlicher Bestandteil des menschlichen Stütz- und Bindegewebes, kommt in verschiedenen Formen in zahlreichen Gewebearten, so auch in der Magenmukosa vor. Diese beherbergt zahlreiche Abwehrzellen, unter anderem neutrophile Granulozyten. Um die Migration von Phagozyten in der kollagenhaltigen Magenmucosa bestmöglich widerzuspiegeln, wurden Kollagengele gegossen, welche die dreidimensionale Matrix des gastralen Bindegewebes simulieren sollten. Ein Chemokingradient sollte hierbei einen Migrationsstimulus für die Granulozyten darstellen. Zunächst wurde das Gemisch aus

Immunzellen und Kollagenlösung in den mittleren Teil einer sogenannten Trecking-Kammer eingefüllt und unter definierten Bedingungen eine Stunde inkubiert. In dieser Zeit erstarrte das Kollagengel-Zell-Gemisch. Der nächste Schritt bestand in der Befüllung eines der seitlichen Wells der Trackingkammer mit einem Chemokin. Um die Ausbildung eines Chemokingradienten per Diffusion durch das dichte mittlerweile erstarrte Kollagengel zu ermöglichen wurde nach dem Einfüllen des Chemokinstimulus 10 min gewartet, bevor schließlich für bis zu 10 min gefilmt wurde.

In Abbildung 34 A ist die Aufschlüsselung eines 10-minütigen Films mit isolierten Granulozyten ohne Infektion und ohne Chemokineinfluss gezeigt. Ein Dreieck entspricht der Gesamtanzahl der Zellen, die in diesen Sektor gewandert sind. Man erkennt an der Bewegung, dass die Zellen vital sind. Jedoch findet hier keine gerichtete Migration statt. Gleiches kann man auch mit Hilfe eines anderen Diagrammtyps belegen. Hier wird die von den Immunzellen absolut zurückgelegte Strecke in  $\mu\text{m}$  veranschaulicht (unteres linkes Diagramm). Abbildung 34 B veranschaulicht dagegen die zielgerichtete Migration von nicht infizierten isolierten Granulozyten in Richtung des Chemokins, hier fMLP. Im Gegensatz zu dHL60-Zellen, welche unter den gleichen Bedingungen eine kaum gerichtete Migration zeigten (Ergebnisse nicht gezeigt), ist bei isolierten Granulozyten von einer intakten Chemotaxis der Zellen auszugehen. Mit Ausnahme weniger Einzelzellen migriert die Mehrheit der Zellen in Richtung des stärker werdenden Chemokingradienten. Man kann erkennen, dass die uninfizierten Zellen, ohne Chemokineinfluss, maximal 20-25  $\mu\text{m}$  weit migrieren, jedoch in unterschiedliche Richtungen. Dies ist als spontane, zufällige Bewegung zu werten. Betrachtet man nun die Bewegung der uninfizierten Zellen unter Chemokinstimulus, so erkennt man eine unipolare Migration dieser in Richtung des 100 nM fMLP-Stimulus. Die längste zurückgelegte Strecke beträgt hier ca. 45  $\mu\text{m}$  und ist somit auch größer als ohne Chemokinstimulus.



**Abbildung 34: Representative Kollagen-gel-Experimente mit uninfizierten Granulozyten**

Zum einen ohne (**A** = die zwei Bilder auf der linken Seite) und zum anderen mit Chemokinstimulus (**B** = die zwei Bilder auf der rechten Seite). Die obere Zeile entspricht je einem sog. Rose plot oder Winkel-Diagramm. Hierbei entspricht ein Dreieck der Gesamtanzahl der Zellen, die in diesen räumlichen Sektor gewandert sind. Die Diagramme in der unteren Zeile beschreiben die exakte Strecke, welche die Zellen migriert sind.

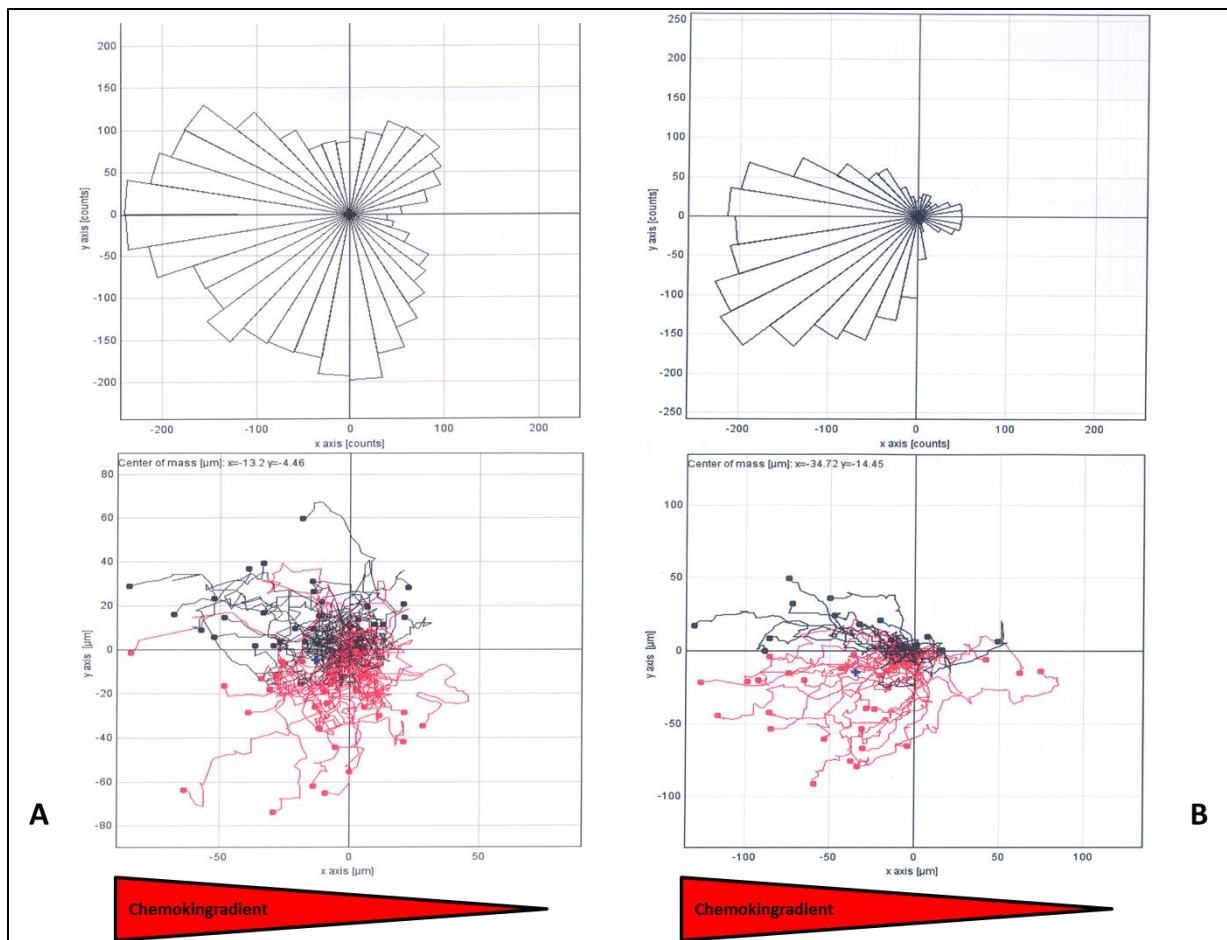
Um den in den Boyden-Chamber Experimenten beobachteten Effekt, dass  $\Delta$ PAI-infizierte Zellen eine bessere Migrationsfähigkeit als die mit Wildtyp (P12) oder anderen *H. pylori*-Mutanten infizierten Zellen aufweisen, zu bestätigen, wurden die isolierten Granulozyten mit P12 oder  $\Delta$ PAI in der Kollagenmatrix für eine Stunde vorinkubiert. Anschließend wurde das Experiment durch Hinzufügen des gleichen Chemokinstimulus gestartet.

Im Experiment zu der Abbildung 35 A wurden die isolierten Granulozyten zuvor mit dem *H. pylori*-Wildtyp-Stamm P12 inkubiert, das Chemokin wurde hier auf der linken Seite des Kollagenslides eingefüllt. Die Zellen reagieren, wie auch in den Boyden-Chamber Experimenten auf den Stimulus. Die längste zurückgelegte Strecke beläuft sich auf ca. 70  $\mu\text{m}$ .



In den Experimenten zu der Abbildung 35 B wurden isolierte Granulozyten mit der *H. pylori*-Mutante  $\Delta$ PAI vorinkubiert. Betrachtet man diese Diagramme, so zeigt sich eine starke Migration nahezu aller Zellen in Richtung des Chemokinstimulus, jedoch nur eine geringe Migration in die entgegengesetzte Richtung des Chemokins.

Verglichen zu den P12-infizierten Zellen (Abbildung 35 A) zeigen hier nur einzelne Zellen und nicht ganze Zellgruppen eine negative, also vom Chemokinstimulus wegführende, Chemotaxis. Bei den  $\Delta$ PAI-infizierten Zellen (Abbildung 35 B) zeigt sich, dass die längste zurückgelegte Strecke weit über 100  $\mu$ m beträgt. Somit wandern die mit der  $\Delta$ PAI-Mutante infizierten Zellen deutlich gerichteter und bei gleicher Dauer der Experimente dementsprechend über eine weitere Strecke als die P12-infizierten isolierten Granulozyten. Insgesamt stellt sich also bei den  $\Delta$ PAI-infizierten Zellen eine effizientere Migration dar.



**Abbildung 35: Representative Kollagengel-Experimente mit infizierten Granulozyten**

Zum einen mit dem *H. pylori*-Wildtyp-Stamm P12 (**A** = die zwei Bilder auf der linken Seite) und zum anderen mit dem Mutationsstamm  $\Delta$ PAI (**B** = die zwei Bilder auf der rechten Seite). Beide Ansätze wurden mit Chemokinstimulus durchgeführt. Die Zellen in den Abbildungen zu B migrieren zielgerichteter und weitere Strecken im Vergleich zu den Zellen unter A.

## IV Diskussion

### 1 Das CagA-Effektorprotein

Einer der Hauptvirulenzfaktoren von *H. pylori* ist das auf der *cag*-Pathogenitätsinsel codierte Effektorprotein CagA. Die Bedeutung dieses Faktors für die Pathogenität des Erregers wird von der Tatsache unterstrichen, dass *cagA*-positive *H. pylori*-Stämme mit weitaus schwerwiegenderen klinischen Verläufen assoziiert sind (Kuipers et al., 1995). So ist es länger bekannt, dass eine Infektion mit *H. pylori*-Stämmen mit intakter *cagPAI* mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms einhergehen (Uemura et al., 2001; Peek et al., 2006). Betrachtet man das CagA-Protein, so ist dieses aus mehreren Untereinheiten aufgebaut, von denen einige, wie zum Beispiel die EPIYA-Motive, gut untersucht sind. CagA wird via dem ebenfalls auf der *cagPAI* lokalisiertem Typ-IV-Sekretionssystem in die Zielzelle transloziert, wobei dieser Prozess für Magenepithelzellen erstmals beschrieben wurde (Odenbreit et al., 2000; Backert et al., 2000). Kurze Zeit später konnte eine Translokation von CagA in Leukozyten nachgewiesen werden (Odenbreit et al., 2001). In der Zielzelle findet sich nun CagA an die innere zytoplasmatische Membran assoziiert und wird dort durch Wirtskinasen, wie beispielsweise c-src, an den EPIYA-Motiven tyrosinphosphoryliert (Lu et al., 2008). Darüberhinaus findet zusätzlich zur Translokation und Tyrosinphosphorylierung in Leukozyten eine proteolytische Prozessierung des CagA-Proteins in ein N-terminales ca. 100 kDa-langes und ein C-terminales ca. 40 kDa-langes Fragment statt (Moese et al. 2001; Odenbreit et al., 2001). Diese Prozessierung wird hauptsächlich nach Translokation in Leukozyten beobachtet. Vorstellbar wäre im Hinblick auf den langen chronisch-persistierenden Krankheitsverlauf ein durch die Prozessierung induzierter immunmodulatorischer Effekt, da Leukozyten eine Vielzahl an immunologischen Funktionen im Körper vermitteln.

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war es, die im CagA-Protein enthaltene Prozessierungsstelle zu lokalisieren und evtl. die Funktion der Prozessierung näher zu charakterisieren. Zu diesem Zwecke wurden mehrere Ziele definiert. Zum einen sollte zunächst die Translokation und Phosphorylierung des CagA-Proteins in verschiedenen Zelllinien und in frisch isolierten humanen Granulozyten untersucht werden. Dabei ging es vor allem um die Darstellung charakteristischer Unterschiede zwischen infizierten Epithelzellen und Phagozyten, wobei bei einem Vergleich der Infektionen von Epithelzellen und Phagozyten mit dem *H. pylori*-Wildtypstamm P12 die Prozessierung in der

Phagozytenzelllinie verifiziert werden konnte. So wird bei der infizierten Phagozytenzelllinie J774 im Gegensatz zu der infizierten Magenepithelzelllinie AGS das CagA des Wildtyp *H. pylori*-Stammes P12 in ein 100 kDa und ein 35 kDa Fragment prozessiert und das 35 kDa Fragment an den enthaltenen EPIYA-Motiven auch Tyrosin-Phosphoryliert. Dies bestätigt die Ergebnisse von Moese et al. und Odenbreit et al. aus dem Jahr 2001.

Zum anderen konnte geklärt werden, wie lange der Translokationsprozess via Typ-IV-Sekretionssystem in die Zielzelle dauert und in welcher gegenseitigen Abhängigkeit Prozessierung und Tyrosinphosphorylierung ablaufen. Ein weiteres wichtiges Ziel stellte die Deletion der Prozessierungsstelle dar, da insbesondere dieser Bereich im *cagA*-Gen bezüglich der Funktion trotz einigen strukturellen Untersuchungen Fragen aufwirft. So ist es vor einigen Jahren gelungen, die kristalline Struktur des CagA-Proteins zu charakterisieren. Hierbei wurden verschieden lange CagA-Varianten produziert. Einige dieser CagA-Teilkonstrukte wurden wie bereits bekannt proteolytisch prozessiert, andere wiederum nicht. Im Zuge dieser Untersuchungen konnte eine Stelle im *cagA*-Gen identifiziert werden, welche sich kurz vor den EPIYA-Motiven befindet und potentielle Spaltungs- oder Prozessierungsfunktion innehat (Angelini et al., 2009). Des Weiteren wurde mittlerweile durch Röntgenstrukturanalyse die Tertiärstruktur des N-terminalen CagA-Fragments ermittelt, welches aus drei distinkten Domänen, denen bestimmte Funktionen zugeordnet werden können, besteht (Hayashi et al., 2012). Doch fehlt uns bis dato das funktionelle Verständnis für die proteolytische Prozessierung des CagA Proteins. Zuletzt sollte daher ein *H. pylori*-Wildtyp-Stamm mit einem *H. pylori*-Stamm mit deletierter Prozessierungsstelle in Translokationsexperimenten mit dem Wildtyp-Stamm verglichen und dabei geklärt werden, ob CagA bei fehlender Prozessierungsstelle noch Tyrosin-Phosphoryliert wird, mit anderen Worten ob die beiden Prozesse der proteolytischen Prozessierung und Tyrosin-Phosphorylierung voneinander unabhängig sind.

## **2 Vergleich der Prozessierungsmutante P12CagA $\Delta$ N6 mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen in Bezug auf Prozessierung und Tyrosin-Phosphorylierung**

Nach Deletion der Prozessierungsstelle des *cagA*-Gens im Bereich von N880 bis N885 und Ersatz der darin erhaltenen sechs Asparagin durch ein Serin, einer neutralen Aminosäure, (Mutante P12CagA $\Delta$ N6) zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp-Stamm mit intakter Prozessierungsstelle, dass keine proteolytische Prozessierung in verschiedenen

phagozytierenden Zielzellen (J774- und THP1-Zelllinie) mehr stattfindet (siehe Abb. 3 und 8, Ergebnisteil), was beweist, dass es sich hierbei um die Prozessierungsstelle handelt. In der Magenepithelzelllinie AGS zeigte sich wie erwartet kein Unterschied zwischen dem Wildtypstamm und der Deletionsmutante, sondern in etwa vergleichbare Mengen an unprozessiertem CagA-Protein. Letzteres deutet darauf hin, dass bei der Herstellung der Deletionsmutante keine unbeabsichtigte Veränderung des Proteins unterlaufen ist. Dies wurde zusätzlich mittels Sequenzierungsdaten bestätigt. Bis dato ist noch ungeklärt ob das Vorhandensein der Prozessierungsstelle auch zu einer erhöhten Virulenz führt, anzunehmen wäre es jedoch, da nicht alle *H. pylori*-Stämme ein *cagA*-Gen, also eine enthaltene Prozessierungsstelle aufweisen und es bekannt ist, dass *cagA*-positive Stämme zu wesentlich schwereren klinischen Verläufen führen (Kuipers et al., 1995).

Unter Verwendung der CagA-Mutanten P12(CagA-F5), einem Wildtypstamm mit N-terminal angefügtem GSK-Tag und P12(CagA-Y5), mit einem hybriden CagA-Protein, in dem alle phosphorylierbaren Tyrosinreste der EPIYA-Motive durch nicht mehr Tyrosin-phosphorylierbare Phenylalaninreste ersetzt sind, des Weiteren mit einem GSK-Tag am N-terminalen Ende, sollte nun die Abhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung von der Prozessierung untersucht werden. In Experimenten mit den Phagozytenzelllinien THP1 und J774 welche mit den CagA-Mutanten P12(CagA-F5)- und P12(CagA-Y5)- infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Tyrosine Phosphorylierung unabhängig von der proteolytischen Prozessierung des CagA-Proteins ist und umgekehrt (siehe Ergebnisteil). Passend hierzu konnte auch in nachfolgenden Experimenten mit der Phagozytenzelllinie J774 gezeigt werden, dass bei Vorbehandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Genistein eine Tyrosinphosphorylierung des CagA-Proteins des *H. pylori*-Wildtyp-Stammes P12 nicht mehr stattfand, dieses jedoch noch proteolytisch prozessiert werden konnte (Busch et al., 2015). Obwohl es in der Literatur in Bezug auf die Funktion der Prozessierungsstelle noch keine Hinweise gibt, lässt sich hierzu folgende Theorie aufstellen. Wenn ohne Prozessierung phosphoryliert werden kann, sollte die Prozessierung keine Voraussetzung für die Translokation sein, da die Translokation den ersten Schritt vor den in der Zielzelle stattfindenden Prozessen darstellt. Theoretisch wäre es auch möglich, dass die Prozessierung ein unspezifischer säurevermittelter Effekt in Phagosomen ist. Dagegen spricht jedoch, dass die Phosphorylierung des CagA-Proteins im Zytoplasma der Zielzelle stattfinden muss, da hier die dafür notwendigen c-scr-Kinasen lokalisiert sind, und zusätzlich die Tatsache, dass auch die spaltungsresistente Mutante noch phosphoryliert wird, was im Zytoplasma und nicht im Phagosom stattfindet.

In Zeitverlauf-Experimenten, bei denen die Infektion zu den Zeitpunkten 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h abgebrochen wurden, konnte gezeigt werden, dass eine deutliche Tyrosinphosphorylierung des *H. pylori* Wildtyp-Stammes P12 (mit intakter Prozessierungsstelle), in THP1-Zellen nach etwa zwei Stunden zu erkennen ist. Ebenso wird das CagA-Protein des *H. pylori*-Stammes mit deletierter Prozessierungsstelle (P12CagAΔN6) in THP1-Zellen nach ca. zwei Stunden in deutlichem Maße Tyrosinphosphoryliert. In beiden Western-Blots erkennt man jedoch auch schon in geringerem Ausmaß nach 30 Minuten und einer Stunde einen schwachen Proteinnachweis (siehe Ergebnisteil). Bezüglich des Zeitverlaufs der Phosphorylierung fand sich kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante, was wiederum die Hypothese stützt, dass die Prozessierung keinen Einfluss auf die Phosphorylierung hat. Ebenso fand im Falle des *H. pylori*-Wildtypstammes P12 die proteolytische Prozessierung in deutlicher Ausprägung nach zwei, in schwächerer Ausprägung jedoch auch schon nach 30 Minuten und einer Stunde, somit zeitgleich zur Tyrosin-Phosphorylierung stattfindet (Ergebnisse nicht gezeigt).

Dass die CagA-Translokation relativ schnell vonstatten geht, konnte kürzlich mittels eines Reporter-Assay, mit dem die CagA-Translokation gemessen wird, gezeigt werden. Hierbei konnte eine komplette Infektion (CagA-Translokation) aller Zellen der Magenepithelzelllinie AGS nach ca. 30 Minuten verzeichnet werden, wobei es im weiteren Zeitverlauf noch zu einem weiteren Anstieg der translozierten CagA Menge kam (Schindele et al., 2015). Hier wäre ein möglicher Summationseffekt mit verstärkter CagA Wirkung zu diskutieren.

### **3 Zusammenfassung der Prozessierungs- und Tyrosinphosphorylierungs-Experimente**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach Verifizierung der proteolytischen Prozessierung des bis dato einzig bekannten Effektorproteins von *H. pylori* CagA in Phagozyten die Prozessierungsstelle im *cagA*-Gen identifiziert und erfolgreich deletiert werden konnte. Mit der so gewonnenen Deletionsmutante (P12CagAΔN6) konnten nun vergleichende Translokations- und Tyrosinphosphorylierungsexperimente in verschiedenen Zelllinien durchgeführt werden. Im Falle der Deletionsmutante (P12CagAΔN6) zeigte sich, dass in verschiedenen Phagozytenzelllinien keine Spaltung des CagA-Proteins mehr verzeichnet werden konnte, das Vollängen-CagA-Protein jedoch noch Tyrosin-Phosphoryliert werden kann. Vice versa konnte bei Verwendung einer Tyrosinphosphorylierungs-defekten Mutante

(P12CagA-Y5) gezeigt werden, dass diese noch proteolytisch prozessiert werden kann. Diese Experimente beweisen erstmals, dass die proteolytische Prozessierung des Effektorproteins CagA in Phagozyten unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung desselben ist und umgekehrt. Des Weiteren ergaben Zeitverlaufsexperimente, dass die proteolytische Prozessierung und die Tyrosin-Phosphorylierung in etwa zeitgleich nach ca. zwei Stunden in deutlichem Ausmaß stattfinden. Diese Beobachtungen können dazu beitragen, zukünftig etwas Licht in das Dunkle um die Funktion der Prozessierungsstelle im *cagA*-Gen und ihr Zusammenspiel mit anderen wichtigen Pathogenitätsprozessen wie der CagA-Translokation und der CagA-Tyrosin-Phosphorylierung zu spenden.

#### **4 Die Bedeutung von CagA-Effektorprotein und Typ-IV-Sekretionssystem auf immunmodulierende Prozesse**

Das auf der *cag*-Pathogenitätsinsel enthaltene und bisher einzig bekannte Effektorprotein CagA und das Typ-IV-Sekretionssystem haben nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Translokation oder der Dephosphorylierung von Zielzellproteinen und der Prozessierung inne, sondern spielen eine maßgebliche, durch all diese Prozesse induzierte Rolle im Hinblick auf die Migration von Leukozyten und die Immunmodulation. So scheint CagA wesentlich an einer Funktionsänderung von dendritischen Zellen, im Rahmen der sogenannten Semimaturierung derselben, beteiligt zu sein (Kaebisch et al., 2014). Unter der sogenannten Semimaturierung wird eine Einschränkung des Maturationsprozesses von dendritischen Zellen mit nachfolgender modulierter Immunantwort verstanden. Des Weiteren ist ein ausgeprägter CagA-Einfluss auf die Genexpression und die Zytoskelettstruktur der infizierten Zielzelle bekannt. Letztere Beobachtung ist in der Literatur für Magenepithelzellen gut dokumentiert (Segal et al., 1999, Backert et al., 2001). Hierbei wird ein massives „Rearrangement“ des Zytoskeletts mit Auflösung der Zell-Zell-Kontakte und eine Veränderung des Zellphänotyps beschrieben, wobei dieser Prozess dem einer Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) ähnelt, welcher im Rahmen der Metastasierung von malignen epithelialen Tumoren beobachtet werden kann (Wessler et al., 2011). Es ist somit denkbar, dass dieser Prozess eine Rolle in der Karzinogenese von Magenepithelzellen spielen könnte.

Eine Inhibition der Leukozytenmigration ist für mehrere andere Typ-III- oder Typ-IV-Sekretionssystem-tragende Bakterienarten, wie zum Beispiel *Salmonella enterica* oder

*Legionella pneumophila*, bekannt (McLaughlin et al., 2009; Simon et al., 2014). Die zweite Fragestellung dieser Arbeit beschäftigte sich daher mit einem potentiellen Einfluss des *cag*Typ-IV-Sekretionssystems auf Leukozyten. Genauer gesagt sollte die Interaktion des Typ-IV-SS mit Phagozyten im Hinblick auf die Migration dieser Zellen untersucht werden. Das Ziel hierbei war herauszufinden, ob eine phagozytäre Migrationshemmung durch *H. pylori* stattfindet und ob diese durch einen T4SS-Einfluss verursacht wird.

In Bezug auf das oben gesagte stellt sich zunächst die Frage, welche Zellen an der *H. pylori*-induzierten Entzündungsreaktion beteiligt sind. Die zumeist im Kindesalter erworbene Infektion mit *H. pylori* induziert in der akuten Phase eine granulozytäre (aktive) Entzündung der antralen Magenmucosa, die sich im Laufe der Zeit zu einer chronisch-persistierenden Entzündung, mit Vorherrschen von Lymphozyten, verschiebt, wobei dendritische Zellen eine wichtige Rolle in der Vermittlung der spezifischen Entzündung spielen (Fehlings et al., 2012). Dies gelingt durch die Kolonisierungs- und Virulenzfaktoren von *H. pylori*, welche es dem Bakterium ermöglichen, jahrzehntelang im Wirt zu persistieren, sofern die Infektion nicht mittels antibiotischer Kombinationstherapie behandelt wird. Selbst bei immunkompetenten Individuen gelingt es dem Immunsystem jedoch nicht, *H. pylori* zu eliminieren, was den Schluss nahe legt, dass das Bakterium die menschliche Immunantwort abschwächt, sich ihr entzieht oder sie auf andere Weise fehlleitet. Besonders interessant für das Phänomen des sogenannten *Immune escape* ist ein möglicher migrationshemmender Einfluss auf menschliche Leukozyten.

Nach *H. pylori*-induzierter Sekretion proinflammatorischer Interleukine wie IL-8 aus Magenepithelzellen (Atherton et al., 2009) wird im Verlauf der Infektion ein reger Kontakt zwischen *H. pylori* und diversen Immunzellen, beispielsweise gastralen neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen, angenommen. Denkbar wäre, dass es durch solche direkten Kontakte zu einer Leukozytenfunktionsmodulierung, im Sinne einer Migrationshemmung kommt. Umsomehr da eine *H. pylori*-T4SS-abhängige Induktion des Adhäsionsmolekül ICAM-1, welches eine Aggregation und somit eine Migrationshemmung von Makrophagen bewirkt, beschrieben ist (Moese et al, 2002). Obwohl bekannt ist, dass im Falle von mit *H. pylori* infizierten dendritischen Zellen keine komplette Inhibition der Migration vollzogen wird, da diese in paragastralen Lymphknoten gefunden werden können (Algood et. al., 2007), wäre es dennoch vorstellbar, dass eine Verlangsamung der Migration zu den lokalen Lymphknotenstationen, durch eine verlängerte *H. pylori* Stimulation gegenüber dendritischen Zellen, einen Überlebensvorteil für *H. pylori* darstellt.



Es wird angenommen, dass es sich bei den Immunzellen mit denen *H. pylori* am wahrscheinlichsten in Kontakt kommt, um dendritischen Zellen, Granulozyten und Makrophagen handelt. Auf Grund der quantitativ ausreichenden Verfügbarkeit von Granulozyten im peripheren Blut, der relativ einfachen Isolation aus demselben und des Vorhandenseins einer etablierten Granulozyten-Zelllinie (dHL60) wurden für die Mehrzahl der Experimente Granulozyten verwendet, unter der Annahme, dass deren Verhalten bezüglich der Migration repräsentativ für die übrigen phagozytierenden Zellen ist.

Um die aus humanem Blut isolierten Zellen zu charakterisieren und somit die Methode zur Präparation von Phagozyten zu validieren, wurden FACS-Analysen mit verschiedenen auf den jeweils nachzuweisenden Zellpopulationen vorhandenen Oberflächenproteinen durchgeführt.

Auch dendritische Zellen, welche zunächst als Monozyten aus Vollblut isoliert und anschließend in der Zellkultur durch Zugabe von GM-CSF (granulocytes macrophage-colony stimulating factor) und IL-4 zu dendritischen Zellen differenziert wurden, wurden im Rahmen von FACS-Analysen untersucht. Hierbei zeigten sich nach ca. einwöchiger Differenzierung uninfizierte dendritische Zellen, welche mit einem CD 11c-Antikörper markiert wurden, wobei CD11c als Oberflächenantigen in hoher Expression auf Dendritischen Zellen und in schwacher Expression auf T- und B-Zellen und der Zelllinie HL60 vorkommt in 85,4 % aller isolierten Zellen positiv. 77,4 % der isolierten Zellen zeigten sich für CD 86, ein Oberflächenantigen auf allen dendritischen Zellen und Monozyten, positiv. Um zu untersuchen wie viel Prozent der isolierten Zellen nicht nur Dendritische Zellen sondern mature (reife) dendritische Zellen waren wurde ein Antikörper gegen CD 83 verwendet, wobei sich eine Positivität von 24,6 % der isolierten Zellen zeigt.

## **5 Chemotaxis**

Zunächst wurde untersucht unter welchen Bedingungen, also mit welchen Zellen und Chemokinkonzentration, die effektivste Chemotaxis etabliert werden kann. Die Experimente wurden ohne Vorinkubation von *H. pylori* und Leukozyten durchgeführt. Da vorhergehend gezeigt wurde, dass die Phosphorylierung nach ca. ein bis zwei Stunden in zunehmend deutlichem Maße stattfindet, kann davon ausgegangen werden, dass bei einer Dauer des Experiments von ca. einer Stunde genügend Zeit für *H. pylori*-induzierte Zellveränderungen

(Dephosphorylierung von Zielzellproteinen, etc.) vorhanden ist. Jedoch galt es dies im Migrationsexperiment zu verifizieren. Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (f-Met-Leu-Phe oder fMLP), ist ein Stoffwechselnebenprodukt bestehend aus drei Aminosäuren welches in geringen Mengen natürlicherweise im Rahmen des bakteriellen Stoffwechsels von anaeroben und aeroben Bakterien, so auch von *H. pylori*, produziert wird. Die formylierte Aminogruppe vermittelt hierbei starke chemotaktische Aktivität in Bezug auf Phagozyten (Anton et al., 1998). Die exakte Menge an von *H. pylori* produziertem fMLP ist derzeit nicht bekannt, jedoch zeigten Hochleistungsflüssigkeitschromatographie- (HPLC) Untersuchungen von humanen Fäzes eine darin enthaltene Gesamtmenge von 5-700 nmol/L fMLP (Roberts et al., 1990). Diese Menge wird also von der Gesamtheit des gastrointestinalen Mikrobioms produziert, so dass im Umkehrschluss von *H. pylori* „alleine“ ein eher kleiner Bruchteil hiervon stammt. Im Falle der dHL60-Zellen und isolierten Granulozyten scheint eine fMLP-Konzentration von 100 nM einen sehr guten und weitaus deutlicheren Migrationseffekt nach sich zu ziehen als jene von 10  $\mu$ M. So zeigen 100 nM einen deutlich positiven Chemotaxisindex bei dHL60-Zellen und isolierten Granulozyten, sodass hier von einer Chemotaxis in Richtung des Chemokins (positive Chemotaxis) gesprochen werden kann, wohingegen die 100-fache Konzentration, von 10  $\mu$ M die Zellen dazu veranlasst, nicht oder in deutlich geringerem Ausmaß, im Vergleich zu Ansätzen ganz ohne Chemokin, zu migrieren. Eine zu starke Chemokinstimulation ist somit nicht förderlich zur Ausbildung eines stabilen und effizienten Chemokingradienten. Möglicherweise könnte es sich hierbei um eine Störung in der Verarbeitung von Chemokinsignalen (sensing) handeln, wobei mittlerweile bekannt ist, dass es sich hierbei um ein hochsensibles Zusammenspiel zwischen Faktoren wie Chemokin-sensing, Adhäsion, zellmorphologische Veränderung und chemotaktische Migration, handelt (Mócsai et al., 2015).

Für die isolierten dendritischen Zellen wurde ein speziell für diese Zellen geeignetes Chemokin, CCL19 getestet und mit fMLP (10 nM) verglichen, wobei unter Verwendung von 5  $\mu$ g/ml CCL19 eine deutlich effizientere Migration mit einem ausgeprägt hohem positiven Chemotaxisindex von 21,5, im Vergleich zu einem Chemotaxisindex von eins bei 10 nM fMLP, erreicht werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich hier festhalten, dass für die Phagozytenzelllinie dHL60, sowie für humane frisch isolierte Granulozyten eine Chemokinkonzentration von 100 nM fMLP, für humane frisch isolierte Dendritische Zellen eine Chemokinkonzentration von 5  $\mu$ g/ml CCL19 mit der positivsten bzw. effizientesten Chemotaxis assoziiert ist. Die weiter unten gezeigten

Unterschiede hinsichtlich der Migration von Wildtyp- und  $\Delta$ PAI-infizierten Zellen deuten darauf hin, dass das *H. pylori*-eigene fMLP die Phagozytenfunktionen nicht komplett derangiert, kleine Störungen können jedoch mit dem verwendeten Experimentaufbau nicht ausgeschlossen werden. Andere mögliche Chemoattraktanzien wären beispielsweise C5a, ein Teil des Komplementsystems oder Leukotrien B<sub>4</sub>, ein proinflammatorisches Arachidonsäurederivat, wobei fMLP standardmäßig, auch für die Zelllinie HL60, Verwendung findet (Liu et al., 2012).

Wie gezeigt werden konnte findet die CagA-Translokation spätestens nach zwei Stunden, aber auch schon nach etwa einer Stunde Infektionszeit in ausreichendem Maße statt. Verschiedene migrationsfähige Immunzellen wurden daher mit unterschiedlichen cag-PAI-Mutanten unterschiedlich lange inkubiert, um anschließend ihre Migrationsfähigkeit im Boyden-Chamber- oder im dreidimensionalen Kollagengel-Ansatz zu vergleichen.

Hierbei zeigt sich zunächst wie vermutet, dass es innerhalb von 30 min noch nicht zu einer ausreichenden intrazellulären Verarbeitung des Chemotaxisindex kommt geschweige denn zu einer hinreichenden Migration. Dies wird verdeutlicht durch einen Chemotaxisindex von unter eins. Nach einer Stunde ist bei dHL60 Zellen die Chemotaxis, mit einem errechneten Chemotaxisindex von 1,6, am effizientesten, nach eineinhalb Stunden ist die Chemotaxis immer noch hinreichend (Chemotaxisindex 1,2), jedoch nicht mehr so effizient, hier am ehesten bedingt durch einen beginnenden Verlust des Chemokingradienten. Darüberhinaus lässt sich in diesen ersten Experimenten eine weitere interessante Beobachtung ablesen;  $\Delta$ PAI-infizierte Zellen migrieren sowohl nach einer Stunde als auch nach eineinhalb Stunden effizienter als Wildtyp(P12)-infizierte Zellen (siehe Ergebnisteil). Dieses Ergebnis lässt sich auch in weiteren Experimenten wiederholen. So zeigte sich eine merkbar effizientere Migration bei  $\Delta$ PAI-infizierten Zellen (Versuchsaufbau mit dHL60 und isolierten Granulozyten) verglichen mit dem Rest der getesteten *H. pylori*-Stämme.

Um die *H. pylori*-induzierten Zellveränderungen möglicherweise deutlicher zur Geltung kommen zu lassen, wurden einige Experimente mit einer Stunde Vorinkubation von Phagozyten und Bakterien durchgeführt. Hierbei zeigt sich der aus Vorexperimenten bekannte  $\Delta$ PAI-Effekt, jedoch ist dieser in diesem Experimentaufbau nicht signifikant. Wie in vorhergehenden Experimenten ohne Vorinkubation, mit dem Hintergedanken, dass in vivo die Interaktion von Immunzellen und Bakterien, nach Zerstörung der mucosalen Zell-Zell-Kontakte, im Bereich des kollagenhaltigen Bindegewebes der gastralen Lamina propria sehr rasch stattfindet, stellte sich auch bei mehreren gleichartig konfigurierten

Migrationsexperimenten mit Granulozyten eine effizientere Migration seitens  $\Delta$ PAI-infizierten gegenüber Wildtyp-(P12)-infizierten Zellen dar, selbst wenn die Vorinkubation fehlt. Dies lässt auf eine rasche immunmodulierende Wirkung seitens des *H. pylori*-Wildtyps oder des T4SS schließen, was einen länger dauernden Transkriptionsfaktor-abhängigen DNA-Effekt eher unwahrscheinlich macht.

### **5.1 Vergleich der $\Delta$ PAI-Mutante mit dem P12-Wildtyp-Stamm in Boyden-Chamber-Migrationsexperimenten**

$\Delta$ PAI-infizierte reife dendritische Zellen migrierten 2,4-mal so effizient wie die Wildtyp-(P12)-infizierten Zellen bei einem Abbruch des Experiments nach 3 h, wobei nach der Hälfte der Zeit zunächst die Wildtyp(P12)-infizierten Zellen effizienter zu migrieren scheinen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die *H. pylori*-induzierten Zellveränderungen bei dendritischen Zellen eine gewisse Zeit benötigen, bis sie sich funktionell auswirken. Fällt die Migration, bei Infektion mit dem *H. pylori*-Wildtyp-Stamm P12 weniger effizient aus, so gilt die Vermutung, dass konsekutiv auch weniger Immunstimulation, bzw. proinflammatorische T-Zell-Aktivierung stattfindet, beziehungsweise die T-Zell-Antwort hin zu einer regulatorisch geprägten Antwort verschoben wird (Kao et al. 2010).

Die Ergebnisse zeigen, dass in einem zwei- bis dreidimensionalen Ansatz, welcher die Boyden-Chamber darstellt,  $\Delta$ PAI-infizierte Zellen eine bessere Migrationsfähigkeit als jene mit Wildtyp-(P12)- oder anderen *H. pylori*-Mutanten-infizierten Zellen aufweisen. Der  $\Delta$ PAI-Mutante fehlt die ganze *cag*-Pathogenitätsinsel, und damit auch das *cag*-Typ4SS und das Effektorprotein CagA. Verglichen einer *H. pylori*-Mutante, welcher nur das Effektorprotein CagA fehlt ( $\Delta$ CagA), migrieren die  $\Delta$ PAI-infizierten Zellen (Versuchsaufbau mit dHL60 und isolierten Granulozyten) deutlich effizienter. Im Umkehrschluss wäre eine mögliche Folgerung, dass der inhibitorische Effekt auf die Migration von Immunzellen von dem Typ-IV-Sekretionssystem, eventuell auch in Kombination mit anderen noch unbekannten Genloci, ausgehen könnte und somit kein reiner CagA-Effekt vorliegt. Des Weiteren verursacht das Typ-IV-Sekretionssystem die verstärkte Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine (Naumann et al., 2005), welche bei Fehlen desselben wegfallen und so ebenfalls die zielgerichtete Elimination von *H. pylori* verhindern könnten.

## **5.2 Vergleich der $\Delta$ PAI-Mutante mit dem P12-Wildtyp-Stamm in Kollagengel-Migrationsexperimenten**

Im Rahmen weiterführender Experimente wurden Kollagengele gegossen, welche die dreidimensionale-Matrix des gastralen Bindegewebes simulieren sollten. So sollte die in-vivo-Situation bestmöglich widergespiegelt werden. Die Aufschlüsselung eines Films mit isolierten humanen Granulozyten ohne Infektion und ohne Chemokineinfluss zeigt hierbei spontane Bewegungen der Zellen, was für die Vitalität der Zellen spricht. Eine gerichtete Migration jedoch, findet ohne Chemokineinfluss nicht statt. Dagegen zeigen humane frisch isolierte Granulozyten konfrontiert mit einem Chemokingradienten, bestehend aus 10 min vor Beginn des Experiments eingefülltem fMLP in der mittels der oben beschriebenen Boyden Chamber Experimenten ermittelten Konzentration von 100 nM, eine zielgerichtete positive Chemotaxis.

Um die in den Boyden Chamber-Experimenten gemachte Beobachtung einer effizienteren Migration von  $\Delta$ PAI infizierten Granulozyten auch innerhalb der Kollagenmatrix zu untersuchen, wurde abermals Wildtyp-(P12)-infizierte Granulozyten mit  $\Delta$ PAI-infizierten Granulozyten verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die  $\Delta$ PAI-infizierten Granulozyten in der gleichen Zeit nicht nur längere Strecken (über 100  $\mu$ m), verglichen mit P12-infizierten Granulozyten (bewältigte Strecke hier 70  $\mu$ m) in Richtung des Chemokingradienten zurücklegten, sondern die Migration im Allgemeinen auch zielgerichteter, also mit weniger Umwegen, stattfindet. In zwischenzeitlich durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine CagA Tyrosin-Phosphorylierung, jedoch nicht eine CagA Prozessierung, für die Migrationsinhibition von Nöten ist. Des Weiteren konnten Unterschiede zwischen zwei- und dreidimensionaler Migration festgestellt werden. So wurde gezeigt, dass *cagPAI* für die Hemmung der Leukozytenmigration in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix eher keine Rolle spielt, wohingegen *cagPAI* die zweidimensionale Leukozytenmigration, repräsentiert durch unter agarose Assays, hemmt (Busch et al., 2015).

## **6 Einordnung der Funktion dendritischer Zellen bei einer *H. pylori*-Infektion unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur**

Dendritische Zellen stellen eine wichtige Gruppe der sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen dar. Sie kommen im Bindegewebe und in Schleimhäuten, so auch in der subepithelialen Magenmucosa vor. Nach Kontakt mit einem Mikroorganismus migrieren sie

durch das Gewebe zu afferenten Lymphgefäßen und gelangen so in die regionären Lymphknotenstationen, wobei währenddessen die Maturierung der Dendritischen Zellen stattfindet. Interessanterweise wurde auch ein direkter Kontakt von dendritischen Zellen und *H.pylori* bei intakter Epithelzellschicht beschrieben. Hierbei scheint es ganz so, als würden die dendritischen Zellen mit Zellausläufern zwischen den Epithelzellen hindurch aktiv nach luminal lokalisiertem *H. pylori* greifen (Necchi et al., 2009). Vor der Migration kommt es zur Phagozytose des aufgenommenen Mikroorganismus. Fragmente des Mikroorganismus werden im Lymphknoten mittels MHC Klasse-II-Molekülen als Antigene präsentiert. So tragen die dendritischen Zellen maßgeblich zu einer T-Zell-Aktivierung bei. Eine proinflammatorische, die Elimination des Mikroorganismus begünstigende T-Zell-Antwort schlägt sich in einer Interleukin-12 und -17 vermittelten Aktivierung von Th1-Zellen nieder (Shiu et al., 2013).

Im Rahmen dieses Prozesses wurde beispielsweise gezeigt, dass eine verlängerte *H. pylori* Exposition bei dendritischen Zellen in einer „Erschöpfung“ derselben resultiert, wobei hier eine verminderte Interleukin-Produktion beobachtet werden kann (Mitchell et.al. 2007). Ein weiterer Faktor, der im Kontext eines „Immune escape“ von Bedeutung zu sein scheint, ist eine beeinträchtigte Maturierung, die sogenannte Semimaturierung der Dendritischen Zellen, welche aus einer *H. pylori*-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 resultiert. Hierbei scheint vor allem die Translokation von CagA eine zentrale Rolle zu spielen. Interessanterweise bedingen semimature dendritische Zellen eine Verschiebung der T-Zell-Aktivierung hin zu einer eher toleranz-geprägten Immunantwort mit verstärkter Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Kaebisch et al., 2014).

Möglicherweise hervorgerufen durch die Semimaturierung beziehungsweise die Erschöpfung der dendritischen Zellen kommt es zu einem modulierten T-Zell-Priming. So wurde zum einen gezeigt, dass das  $T_{reg}/T_H17$ -Verhältnis via *H. pylori*-exponierte dendritische Zellen zu Gunsten der regulatorischen T-Zellen verschoben ist, wobei die spezielle  $T_H17$ -vermittelte proinflammatorische Immunantwort konsekutiv vermindert ist, was eine chronische Persistenz von *H. pylori* begünstigt (Kao et al. 2010). Ähnliche Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen veröffentlicht werden. Zum Beispiel wiesen Oertli et al. nach, dass eine *H. pylori*-Exposition von dendritischen Zellen in vitro und in vivo eine durch den Transkriptionsfaktor forkhead transcription factor (FoxP3) induzierte Vermehrung von regulatorischen T-Zellen anstatt einer effektiven T-Zell vermittelten Immunantwort gegen *H. pylori* hervorruft. Diese Beobachtungen könnten eine Erklärung dafür darstellen, dass

Patienten mit *H. pylori*-Infektion eher vor Autoimmunkrankheiten geschützt sind (McCune et al., 2003). Mögliche Schlüsselrollen im Rahmen der T-Zell-Modulierung sind für die *H. pylori*  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase (GGT), das *H. pylori* Vakuolisierendem Cytotoxin (VacA) und das cytotoxin-assoziierte Antigen (CagA) beschrieben (Oertli et al. 2012, Keabisch et al., 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die parenterale Gabe eines Impfstoffes, bestehend aus einem Mycobacteriumzellwandanteil (CAF01) und Ganzzell-*H. pylori*-Anteil eine protektive Immunantwort in Mäusen induziert, wobei es hier zu erhöhten Spiegeln von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen kommt (Hitzler et al. 2011).

## 7 Zusammenfassung der Migrationsexperimente

Zusammenfassend unterstreichen die oben genannten Studien, die eminente Bedeutung der Zeit, welche *H. pylori*-exponierte dendritische Zellen benötigen, um die lokalen Lymphknotenstationen zu erreichen, da hierdurch die Immunantwort maßgeblich beeinflusst wird. Schon des Längeren ist es erwiesen, dass während einer *H. pylori*-Infektion die Anzahl an Gewebphagozyten in der Magenschleimhaut signifikant erhöht ist (Bergin et al., 2004). Immer noch ist es jedoch nicht geklärt, wie es *H. pylori* gelingt der körpereigenen Immunabwehr zu entgehen, obwohl es schon mehrere Nachweise einzelner Mechanismen existieren. Beispielsweise ist eine Suppression der T-Zellvermittelten Immunität beschrieben (Salama et al., 2013). In Bezug auf Dendritische Zellen gibt es bereits mehrere Nachweise, die eine durch Semimaturierung oder Erschöpfung der Dendritischen Zellen, verstärkte regulatorische T-Zell-Antwort beweisen (Mitchell et al., 2007; Kao et al., 2010; Kaebisch et al., 2014). Trotz der Fähigkeit *H. pylori*-infizierter dendritischer Zellen CCL19-gerichtet zu migrieren (Hansson et al., 2006), wird angenommen, dass diese verspätet in gastralen Lymphknotenstationen ankommen. In dieser Arbeit konnte ein inhibitorischer Migrationseffekt für *H. pylori*-infizierte Phagozyten, genauer gesagt, dHL60, sowie aus humanem Blut isolierte Granulozyten und dendritische Zellen beobachtet werden. Durch Infektion der Phagozyten mit verschiedenen Mutantenstämmen konnte der inhibitorische Migrationseffekt eingrenzt werden, wobei sich eine reproduzierbare Tendenz der  $\Delta$ PAI-infizierten Zellen zeigte. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei  $\Delta$ CagA- und  $\Delta$ VacA- infizierten Zellen kein auffälliges migrationsinhibitorisches Resultat. Da die verbesserte Migration der  $\Delta$ PAI-infizierten Zellen im Vergleich mit uninfizierten Zellen jedoch eher gering- bis mäßiggradig ausgeprägt war, liegt der Schluss nahe, dass es sich bei der Migrationsinhibition

nicht um einen alleinigen *cagPAI*-, sondern vielmehr um einen Summationseffekt auf Grund mehrerer noch unbekannter Faktoren handelt. Hierauf bezogen konnte in nachfolgenden Experimenten eine merkliche Inhibition der Leukozytenmigration durch das *H. pylori*-Außenmembranprotein HopQ nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise zeigte sich bei Infektion mit einer  $\Delta$ hopQ-Mutante auch eine schwächere CagA-Tyrosin-Phosphorylierung, sodass in Zukunft verstärktes Augenmerk auf das Zusammenspiel der Prozesse der Tyrosin-Phosphorylierung und der Leukozytenmigration gelegt werden sollte (Busch et al., 2015).



## V Literaturverzeichnis

- Alahdab, Y. O. and C. Kalayci (2014). "Helicobacter pylori: management in 2013." *World journal of gastroenterology : WJG* 20(18): 5302–5307.
- Algood, H. M., Gallo-Romero, J., Wilson, K. T., Peek, R. M., Jr., & Cover, T. L. (2007). "Host response to Helicobacter pylori infection before initiation of the adaptive immune response." *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51(3), 577-586.
- Alzahrani, S., et al. (2014). "Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cells." *World J Gastroenterol* 20(36): 12767-12780.
- Amieva, M. R., et al. (2003). "Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA." *Science*, 300(5624), 1430-1434.
- Amulic, B., et al. (2012). "Neutrophil function: from mechanisms to disease." *Annu Rev Immunol* 30: 459-489.
- Angelini, A., Tosi, T., Mas, P., Acajjaoui, S., Zanotti, G., Terradot, L., & Hart, D. J. (2009). "Expression of Helicobacter pylori CagA domains by library-based construct screening." *FEBS J*, 276(3), 816-824.
- Anton, P., O'Connell, J., O'Connell, D., Whitaker, L., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., & Shanahan, F. (1998). "Mucosal subepithelial binding sites for the bacterial chemotactic peptide, formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)." *Gut*, 42(3), 374-379.
- Appelmek, B. J., et al. (2000). "Why Helicobacter pylori has Lewis antigens." *Trends Microbiol* 8(12): 565-570.
- Asahi, M., et al. (2000). "Helicobacter pylori CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells." *The Journal of experimental medicine* 191(4): 593–602.
- Atherton, J. C. and M. J. Blaser (2009). "Coadaptation of Helicobacter pylori and humans: ancient history, modern implications." *J Clin Invest* 119(9): 2475-2487.
- Atherton, J. C., et al. (1995). "Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration." *The Journal of biological chemistry* 270(30): 17771–17777.
- Backert, S., et al. (2001). "Phosphorylation of tyrosine 972 of the Helicobacter pylori CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells." *Mol Microbiol* 42(3): 631-644.
- Backert, S., et al. (2001). "Tyrosine phosphorylation patterns and size modification of the Helicobacter pylori CagA protein after translocation into gastric epithelial cells." *Proteomics* 1(4): 608–617.
- Backert, S., et al. (2000). "Translocation of the Helicobacter pylori CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus." *Cellular microbiology* 2(2): 155–164.
- Bamford, K. B., et al. (1998). "Lymphocytes in the human gastric mucosa during Helicobacter pylori have a T helper cell 1 phenotype." *Gastroenterology* 114(3): 482-492.
- Basso, D., et al. (2008). "Clinical relevance of Helicobacter pylori cagA and vacA gene polymorphisms." *Gastroenterology* 135(1): 91–99.
- Beales, I. L. and J. Calam (1997). "Helicobacter pylori stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) production from cultured antral biopsies and a human gastric epithelial cell line." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9(5): 451-455.
- Belogolova, E., et al. (2013). "Helicobacter pylori outer membrane protein HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor." *Cellular microbiology* 15(11): 1896–1912.

- Bergin, P. J., Anders, E., Sicheng, W., Erik, J., Jennie, A., Hans, L., Marianne, Q. J. (2004). "Increased production of matrix metalloproteinases in *Helicobacter pylori*-associated human gastritis." *Helicobacter*, 9(3), 201-210. doi:10.1111/j.1083-4389.2004.00232.
- Bergman, M. P., et al. (2004). "Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN." *J Exp Med* 200(8): 979-990.
- Blaser, M. J. (1997). "Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach." *The Journal of clinical investigation* 100(4): 759-762.
- Bliss, C. M., Jr., et al. (1998). "Helicobacter pylori lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes." *Infect Immun* 66(11): 5357-5363.
- Boncrisiano, M., et al. (2003). "The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms." *The Journal of experimental medicine* 198(12): 1887-1897.
- Borén, T., et al. (1993). "Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens." *Science (New York, N.Y.)* 262(5141): 1892-1895.
- Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes." *J Exp Med*, 115, 453-466.
- Buhrdorf, R., et al. (2003). "Topological analysis of a putative virB8 homologue essential for the cag type IV secretion system in *Helicobacter pylori*." *Int J Med Microbiol* 293(2-3): 213-217.
- Busch, B., Weimer, R., Woischke, C., Fischer, W., & Haas, R. (2015). "Helicobacter pylori interferes with leukocyte migration via the outer membrane protein HopQ and via CagA translocation." *Int J Med Microbiol*, 305(3), 355-364.
- Censini, S., et al. (1996). "cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(25): 14648-14653.
- Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., & Gallo, R. C. (1978). "Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(5), 2458-2462.
- Cook, K. W., et al. (2014). "CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa." *Gut* 63(10): 1550-1559.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* 420(6917): 860-867.
- Covacci, A., et al. (1993). "Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(12): 5791-5795.
- Covacci, A., et al. (1999). "Helicobacter pylori virulence and genetic geography." *Science* 284(5418): 1328-1333.
- Cover, T. L., et al. (1992). "Serum neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*." *The Journal of clinical investigation* 90(3): 913-918.
- Crabtree, J. E., et al. (1995). "Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*." *J Clin Pathol* 48(10): 967-969.
- Dailidienė, D., et al. (2006). "Contraselectable streptomycin susceptibility determinant for genetic manipulation and analysis of *Helicobacter pylori*." *Appl Environ Microbiol* 72(9): 5908-5914.
- Dehesa, M., et al. (1991). "High prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic Hispanics." *J Clin Microbiol*, 29(6), 1128-1131.
- Desvaux, M., et al. (2009). "Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue." *Trends Microbiol* 17(4): 139-145.

- Eaton, K. A., et al. (1991). "Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets." *Infection and immunity* 59(7): 2470–2475.
- Eaton, K. A., et al. (1996). "Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes." *Infection and immunity* 64(7): 2445–2448.
- El-Omar, E. M., et al. (2000). "Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer." *Nature* 404(6776): 398–402.
- Evans, D. J. and D. G. Evans (2000). "*Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives." *Helicobacter* 5(4): 183–195.
- Fedwick, J. P., et al. (2005). "*Helicobacter pylori* activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability." *Infection and immunity* 73(12): 7844–7852.
- Fehlings, M., Drobbe, L., Moos, V., Renner Viveros, P., Hagen, J., Beigier-Bompadre, M., Ignatius, R. (2012). "Comparative analysis of the interaction of *Helicobacter pylori* with human dendritic cells, macrophages, and monocytes." *Infect Immun*, 80(8), 2724–2734.
- Figueira, R. and D. W. Holden (2012). "Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors." *Microbiology (Reading, England)* 158(Pt 5): 1147–1161.
- Filloux, A. (2013). "The rise of the Type VI secretion system." *F1000Prime Rep* 5: 52.
- Fischer, W., et al. (2001). "Outer membrane targeting of passenger proteins by the vacuolating cytotoxin autotransporter of *Helicobacter pylori*." *Infection and immunity* 69(11): 6769–6775.
- Fischer, W., et al. (2009). "Virulence mechanisms and persistence strategies of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*." *Curr Top Microbiol Immunol* 337: 129–171.
- Fischer, W., et al. (2001). "Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8." *Mol Microbiol* 42(5): 1337–1348.
- Fischer, W., Windhager, L., Rohrer, S., Zeiller, M., Karnholz, A., Hoffmann, R., Haas, R. (2010). "Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer." *Nucleic Acids Res*, 38(18), 6089–6101.
- Franco, A. T., et al. (2008). "Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors." *Cancer research* 68(2): 379–387.
- Friis-Hansen, L. (2006). "Achlorhydria is associated with gastric microbial overgrowth and development of cancer: lessons learned from the gastrin knockout mouse." *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 66(7): 607–621.
- Frye, M., et al. (2000). "Differential expression of human alpha- and beta-defensins mRNA in gastrointestinal epithelia." *Eur J Clin Invest* 30(8): 695–701.
- Fujikawa, A., et al. (2003). "Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*." *Nature genetics* 33(3): 375–381.
- Galkin, V. E., et al. (2008). "Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments." *Science* 320(5874): 382–385.
- Galmiche, A., et al. (2000). "The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release." *The EMBO journal* 19(23): 6361–6370.
- Gebert, B., et al. (2003). "*Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation." *Science (New York, N.Y.)* 301(5636): 1099–1102.
- Geis, G., et al. (1993). "Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*." *Journal of medical microbiology* 38(5): 371–377.

- Geissmann, F., et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* 327(5966): 656-661.
- Genisset, C., et al. (2007). "The concerted action of the *Helicobacter pylori* cytotoxin VacA and of the v-ATPase proton pump induces swelling of isolated endosomes." *Cellular microbiology* 9(6): 1481–1490.
- Haas, R., et al. (1993). "Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis." *Mol Microbiol* 8(4): 753-760.
- Hacker, J., et al. (1990). "Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates." *Microbial pathogenesis* 8(3): 213–225.
- Hacker, J., et al. (1997). "Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution." *Molecular microbiology* 23(6): 1089–1097.
- Hafsi, N., et al. (2004). "Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro." *J Immunol* 173(2): 1249-1257.
- Hagymási, K. and Z. Tulassay (2014). "*Helicobacter pylori* infection: new pathogenetic and clinical aspects." *World journal of gastroenterology : WJG* 20(21): 6386–6399.
- Hansson, M., Lundgren, A., Elgbratt, K., Quiding-Jarbrink, M., Svennerholm, A. M., & Johansson, E. L. (2006). "Dendritic cells express CCR7 and migrate in response to CCL19 (MIP-3 $\beta$ ) after exposure to *Helicobacter pylori*." *Microbes Infect*, 8(3), 841-850.
- Hase, K., et al. (2003). "Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*." *Gastroenterology* 125(6): 1613-1625.
- Hayashi, T., Senda, M., Morohashi, H., Higashi, H., Horio, M., Kashiba, Y., Hatakeyama, M. (2012). "Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA." *Cell Host Microbe*, 12(1), 20-33.
- Herold, G. (2009). *Innere Medizin 2009*: Köln, Selbstverl.
- Higashi, H., et al. (2002). "SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein." *Science* 295(5555): 683-686.
- Higashi, H., et al. (2005). "EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells." *The Journal of biological chemistry* 280(24): 23130–23137.
- Hitzler, I., Oertli, M., Becher, B., Agger, E. M., & Muller, A. (2011). "Dendritic cells prevent rather than promote immunity conferred by a *helicobacter* vaccine using a mycobacterial adjuvant." *Gastroenterology*, 141(1), 186-196, 196 e181.
- Ho, S. B., et al. (2004). "The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins." *Digestive diseases and sciences* 49(10): 1598–1606.
- Hofreuter, D., et al. (2001). "Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system." *Mol Microbiol* 41(2): 379-391.
- Hofreuter, D., et al. (1998). "Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the comB locus." *Mol Microbiol* 28(5): 1027-1038.
- Hohlfeld, S., Pattis, I., Puls, J., Plano, G. V., Haas, R., & Fischer, W. (2006). "A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein." *Mol Microbiol*, 59(5), 1624-1637.
- Holmes, D. S., & Quigley, M. (1981). "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids." *Anal Biochem*, 114(1), 193-197.

- Hornsby, M. J., et al. (2008). "Helicobacter pylori induces an antimicrobial response in rhesus macaques in a cag pathogenicity island-dependent manner." *Gastroenterology* 134(4): 1049-1057.
- Ilver, D., et al. (1998). "Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging." *Science (New York, N.Y.)* 279(5349): 373–377.
- Ilver, D., et al. (2004). "Helicobacter pylori toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism." *Cellular microbiology* 6(2): 167–174.
- Jimenez-Soto, L. F., et al. (2009). "Helicobacter pylori type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner." *PLoS Pathog* 5(12): e1000684.
- Kaebisch, R., et al. (2014). "Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A impairs human dendritic cell maturation and function through IL-10-mediated activation of STAT3." *J Immunol* 192(1): 316-323.
- Kao, J. Y., et al. (2010). "Helicobacter pylori immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice." *Gastroenterology* 138(3): 1046-1054.
- Kaplan-Turkoz, B. and Terradot, L. (2013). "Structure and mode of injection of the oncoprotein CagA of Helicobacter pylori." *Med Sci (Paris)*, 29(1), 33-36.
- Khamri, W., et al. (2010). "Helicobacter pylori stimulates dendritic cells to induce interleukin-17 expression from CD4+ T lymphocytes." *Infect Immun* 78(2): 845-853.
- Klausz, G., et al. (2003). "Local and peripheral cytokine response and CagA status of Helicobacter pylori-positive patients with duodenal ulcer." *Eur Cytokine Netw* 14(3): 143-148.
- Koppel, E. A., et al. (2005). "Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation." *Cell Microbiol* 7(2): 157-165.
- Kranzer, K., et al. (2004). "Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by Helicobacter pylori." *Infect Immun* 72(8): 4416-4423.
- Kuipers, E. J., et al. (1995). "Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status." *Journal of the National Cancer Institute* 87(23): 1777–1780.
- Kutter, S., et al. (2008). "Protein subassemblies of the Helicobacter pylori Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies." *J Bacteriol* 190(6): 2161-2171.
- Kwok, T., et al. (2007). "Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation." *Nature* 449(7164): 862-866.
- Labigne, A., et al. (1991). "Shuttle cloning and nucleotide sequences of Helicobacter pylori genes responsible for urease activity." *Journal of bacteriology* 173(6): 1920–1931.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lämmermann, T. and M. Sixt (2009). "Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration." *Curr Opin Cell Biol* 21(5): 636-644.
- Lee, J. Y. and N. Kim (2015). "Diagnosis of Helicobacter pylori by invasive test: histology." *Annals of translational medicine* 3(1): 10.
- Lee, S. K., et al. (2003). "Helicobacter pylori flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5." *Microbes Infect* 5(15): 1345-1356.
- Leunk, R. D., et al. (1988). "Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of Campylobacter pylori." *Journal of medical microbiology* 26(2): 93–99.
- Lindén, S., et al. (2002). "Strain- and blood group-dependent binding of Helicobacter pylori to human gastric MUC5AC glycoforms." *Gastroenterology* 123(6): 1923–1930.

- Liu, F. C., Day, Y. J., Liou, J. T., Yu, H. P., & Liao, H. R. (2012). "Splitomicin inhibits fMLP-induced superoxide anion production in human neutrophils by activate cAMP/PKA signaling inhibition of ERK pathway." *Eur J Pharmacol*, 688(1-3), 68-75.
- Llosa, M., et al. (2000). "The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis." *J Bacteriol* 182(12): 3437-3445.
- Lopes, A. I., et al. (2014). "Helicobacter pylori infection - recent developments in diagnosis." *World journal of gastroenterology : WJG* 20(28): 9299–9313.
- Lu, H., et al. (2005). "Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*." *Molecular biology of the cell* 16(10): 4954–4966.
- Lu, H. S., Saito, Y., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Zhang, H. M., Higashi, H., & Hatakeyama, M. (2008). "Structural and functional diversity in the PAR1b/MARK2-binding region of *Helicobacter pylori* CagA." *Cancer Sci*, 99(10), 2004-2011. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00950.
- Lundgren, A., et al. (2005). "Mucosal FOXP3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients." *Infect Immun* 73(1): 523-531.
- Lytton, S. D., et al. (2005). "Production of ammonium by *Helicobacter pylori* mediates occludin processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells." *Microbiology (Reading, England)* 151(Pt 10): 3267–3276.
- Mahdavi, J., et al. (2002). "Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation." *Science (New York, N.Y.)* 297(5581): 573–578.
- Marcos, N. T., et al. (2008). "Helicobacter pylori induces beta3GnT5 in human gastric cell lines, modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x." *The Journal of clinical investigation* 118(6): 2325–2336.
- Marshall, B. and Warren J. R. (1984). "Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration": Originally published as Volume 1, Issue 8390." *The Lancet* 323(8390): 1311–1315.
- Marshall, B. J., et al. (1990). "Urea protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid." *Gastroenterology* 99(3): 697–702.
- Matteo, M. J., et al. (2007). "Helicobacter pylori cag pathogenicity island genotype diversity within the gastric niche of a single host." *Journal of medical microbiology* 56(Pt 5): 664–669.
- McCune, A., Lane, A., Murray, L., Harvey, I., Nair, P., Donovan, J., & Harvey, R. (2003). "Reduced risk of atopic disorders in adults with *Helicobacter pylori* infection." *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 15(6), 637-640.
- McLaughlin, L. M., Govoni, G. R., Gerke, C., Gopinath, S., Peng, K., Laidlaw, G., Monack, D. (2009). "The *Salmonella* SPI2 effector SseI mediates long-term systemic infection by modulating host cell migration." *PLoS Pathog*, 5(11), e1000671.
- Mimuro, H., et al. (2002). "Grb2 is a key mediator of helicobacter pylori CagA protein activities." *Mol Cell* 10(4): 745-755.
- Mitchell, P., Germain, C., Fiori, P. L., Khamri, W., Foster, G. R., Ghosh, S., Lombardi, G. (2007). "Chronic exposure to *Helicobacter pylori* impairs dendritic cell function and inhibits Th1 development." *Infect Immun*, 75(2), 810-819.
- Moese, S., Selbach, M., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P. R., Meyer, T. F., & Backert, S. (2001). "Identification of a tyrosine-phosphorylated 35 kDa carboxy-terminal fragment (p35CagA) of the *Helicobacter pylori* CagA protein in phagocytic cells: processing or breakage?" *Proteomics*, 1(4), 618-629.
- Moese, S., et al. (2002). "cag<sup>+</sup> *Helicobacter pylori* induces homotypic aggregation of macrophage-like cells by up-regulation and recruitment of intracellular adhesion molecule 1 to the cell surface." *Infect Immun* 70(8): 4687-4691.

- Moese, S., et al. (2007). "The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin." *Cell Microbiol* 9(5): 1148-1161.
- Molinari, M., et al. (1998). "Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA." *The Journal of experimental medicine* 187(1): 135-140.
- Montecucco, C., et al. (1996). "Bacterial protein toxins and cell vesicle trafficking." *Experientia* 52(12): 1026-1032.
- Mocsai, A., Walzog, B., & Lowell, C. A. (2015). Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovasc Res*, 107(3), 373-385.
- Muotiala, A., et al. (1992). "Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide." *Infect Immun* 60(4): 1714-1716.
- Naito, M., et al. (2006). "Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA." *Gastroenterology* 130(4): 1181-1190.
- Naumann, M. (2005). Pathogenicity island-dependent effects of *Helicobacter pylori* on intracellular signal transduction in epithelial cells. *Int J Med Microbiol*, 295(5), 335-341.
- Necchi, V., et al. (2009). "Evidence for transepithelial dendritic cells in human *H. pylori* active gastritis." *Helicobacter* 14(3): 208-222.
- Odenbreit, S. (2005). "Adherence properties of *Helicobacter pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host." *International journal of medical microbiology : IJMM* 295(5): 317-324.
- Odenbreit, S., et al. (2001). "Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA." *Cellular microbiology* 3(1): 21-31.
- Odenbreit, S., et al. (2002). "CagA tyrosine phosphorylation and interleukin-8 induction by *Helicobacter pylori* are independent from alpAB, HopZ and bab group outer membrane proteins." *Int J Med Microbiol* 292(3-4): 257-266.
- Odenbreit, S., et al. (2000). "Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion." *Science (New York, N.Y.)* 287(5457): 1497-1500.
- Odenbreit, S., et al. (2009). "Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates." *Infection and immunity* 77(9): 3782-3790.
- Odenbreit, S., et al. (1999). "Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue." *Molecular microbiology* 31(5): 1537-1548.
- Oertli, M., & Muller, A. (2012). "*Helicobacter pylori* targets dendritic cells to induce immune tolerance, promote persistence and confer protection against allergic asthma." *Gut Microbes*, 3(6), 566-571.
- Ogura, K., et al. (2000). "Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil." *The Journal of experimental medicine* 192(11): 1601-1610.
- Ohnishi, S., et al. (2013). "DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013: 387014.
- Peck, B., et al. (1999). "Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*." *Nucleic acids research* 27(16): 3325-3333.
- Peek, R. M. and J. E. Crabtree (2006). "*Helicobacter* infection and gastric neoplasia." *The Journal of pathology* 208(2): 233-248.
- Peek, R. M., Jr., et al. (1995). "Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains." *Lab Invest* 73(6): 760-770.

- Prabhu, V. and A. Shivani (2014). "An overview of history, pathogenesis and treatment of perforated peptic ulcer disease with evaluation of prognostic scoring in adults." *Annals of medical and health sciences research* 4(1): 22–29.
- Püls, J., et al. (2002). "Activation of *Helicobacter pylori* CagA by tyrosine phosphorylation is essential for dephosphorylation of host cell proteins in gastric epithelial cells." *Molecular microbiology* 43(4): 961–969.
- Rad, R., et al. (2006). "CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo." *Gastroenterology* 131(2): 525–537.
- Reyrat, J. M., et al. (1999). "Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin." *Molecular microbiology* 34(2): 197–204.
- Rhead, J. L., et al. (2007). "A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer." *Gastroenterology* 133(3): 926–936.
- Rieder, G., et al. (1997). "Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis." *Infect Immun* 65(9): 3622–3630.
- Rieder, G., et al. (2005). "*Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils." *Gastroenterology* 128(5): 1229–1242.
- Roberts, E. C., Hobson, C. H., Anderson, R. P., & Chadwick, V. S. (1990). Radio-immunoassay for formyl methionyl leucyl phenylalanine. II. Demonstration of an enterohepatic circulation of immunoreactive bacterial chemotactic peptides in man. *J Gastroenterol Hepatol*, 5(1), 38–43.
- Robinson, K., et al. (2008). "*Helicobacter pylori*-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses." *Gut* 57(10): 1375–1385.
- Rohrer, S. (2010). "Charakterisierung der Typ-IV-Sekretionssysteme und der kryptischen Plasmide von *Helicobacter pylori* hinsichtlich ihrer Beteiligung am DNA-Transfer." Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München Doktor der Naturwissenschaften
- Saadat, I., et al. (2007). "*Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity." *Nature* 447(7142): 330–333.
- Saiki, R. K., et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487–491.
- Salama, N. R., Hartung, M. L., & Muller, A. (2013). "Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*." *Nat Rev Microbiol*, 11(6), 385–399.
- Sambrook, J. and Russel, D. (1982). "Molecular Cloning - A laboratory manual." New York Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Zauco, N. A., et al. (2014). "Impact of cagPAI and T4SS on the inflammatory response of human neutrophils to *Helicobacter pylori* infection." *PLoS One* 8(6): e64623.
- Sanger, F., et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463–5467.
- Satin, B., et al. (1997). "Effect of *helicobacter pylori* vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation." *The Journal of biological chemistry* 272(40): 25022–25028.
- Schindele, F., Weiss, E., Haas, R., & Fischer, W. (2015). "Quantitative analysis of CagA type IV secretion by *Helicobacter pylori* reveals substrate recognition and translocation requirements." *Mol Microbiol*.
- Schmitt, W. and R. Haas (1994). "Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein." *Molecular microbiology* 12(2): 307–319.



- Schreiber, S., et al. (2005). "Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo." *Infection and immunity* 73(3): 1584–1589.
- Schreiber, S., et al. (2004). "The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(14): 5024–5029.
- Schubert, S., et al. (2004). "The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects." *International journal of medical microbiology : IJMM* 294(2-3): 83–94.
- Scott, D. R., et al. (2000). "Expression of the *Helicobacter pylori* ureI gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease." *Infection and immunity* 68(2): 470–477.
- Scott, D. R., et al. (1998). "The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*." *Gastroenterology* 114(1): 58–70.
- Segal, E. D. (1997). "Consequences of attachment of *Helicobacter pylori* to gastric cells." *Biomed Pharmacother* 51(1): 5-12.
- Segal, E. D., et al. (1999). "Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25): 14559-14564.
- Segal, E. D. and L. S. Tompkins (1993). "Transformation of *Helicobacter pylori* by electroporation." *Biotechniques* 14(2): 225-226.
- Selbach, M., et al. (2004). "The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin." *Proteomics* 4(10): 2961-2968.
- Selbach, M., et al. (2002). "Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo." *The Journal of biological chemistry* 277(9): 6775–6778.
- Selbach, M., et al. (2003). "The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation." *The EMBO journal* 22(3): 515–528.
- Serbina, N. V., et al. (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." *Annu Rev Immunol* 26: 421-452.
- Sewald, X., et al. (2008). "Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin." *Cell Host Microbe* 3(1): 20-29.
- Sharma, S. A., et al. (1995). "Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro." *Infect Immun* 63(5): 1681-1687.
- Shea, J. E., et al. (1996). "Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(6): 2593–2597.
- Shigekawa, K. and W. J. Dower (1988). "Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells." *Biotechniques* 6(8): 742-751.
- Shiu, J., et al. (2013). "IRAK-M expression limits dendritic cell activation and proinflammatory cytokine production in response to *Helicobacter pylori*." *PLoS One* 8(6): e66914.
- Simon, S., Wagner, M. A., Rothmeier, E., Muller-Taubenberger, A., & Hilbi, H. (2014). "Icm/Dot-dependent inhibition of phagocyte migration by *Legionella* is antagonized by a translocated Ran GTPase activator." *Cell Microbiol*, 16(7), 977-992.
- Smith, M. F., Jr., et al. (2003). "Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells." *J Biol Chem* 278(35): 32552-32560.
- Solnick, J. V. and D. B. Schauer (2001). "Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases." *Clinical microbiology reviews* 14(1): 59–97.

- Stein, M., et al. (2002). "c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs." *Molecular microbiology* 43(4): 971–980.
- Stein, M., et al. (2000). "Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(3): 1263–1268.
- Stingl, K. and H. d. Reuse (2005). "Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity?" *International journal of medical microbiology : IJMM* 295(5): 307–315.
- Stingl, K., et al. (2002). "Energetics of *Helicobacter pylori* and its implications for the mechanism of urease-dependent acid tolerance at pH 1." *Journal of bacteriology* 184(11): 3053–3060.
- Suerbaum, S., et al. (1993). "Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of H. pylori flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange." *Journal of bacteriology* 175(11): 3278–3288.
- Sundrud, M. S., et al. (2004). "Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(20): 7727–7732.
- Telford, J. L., et al. (1994). "Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease." *The Journal of experimental medicine* 179(5): 1653–1658.
- Tomb, J. F., et al. (1997). "The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*." *Nature* 388(6642): 539–547.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354.
- Tran, A. X., et al. (2006). "The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin." *J Bacteriol* 188(12): 4531-4541.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)". *Int J Cancer*, 26(2), 171-176.
- Tsutsumi, R., et al. (2006). "Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA." *Mol Cell Biol* 26(1): 261-276.
- Tummuru, M. K., et al. (1993). "Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production." *Infection and immunity* 61(5): 1799–1809.
- Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Schlemper, R. J. (2001). "*Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer." *N Engl J Med*, 345(11), 784-789.
- Van den Brink, G. R., et al. (2000). "H pylori colocalises with MUC5AC in the human stomach." *Gut* 46(5): 601–607.
- Venerito, M., et al. (2013). "Meta-analysis of bismuth quadruple therapy versus clarithromycin triple therapy for empiric primary treatment of *Helicobacter pylori* infection." *Digestion* 88(1): 33–45.
- Watari, J., et al. (2014). "*Helicobacter pylori* associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development." *World journal of gastroenterology : WJG* 20(18): 5461–5473.
- Wessler, S. and S. Backert (2008). "Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*." *Trends Microbiol* 16(8): 397-405.

- Wessler, S., Gimona, M., & Rieder, G. (2011). "Regulation of the actin cytoskeleton in *Helicobacter pylori*-induced migration and invasive growth of gastric epithelial cells." *Cell Commun Signal*, 9(1), 27.
- Willhite, D. C. and S. R. Blanke (2004). "*Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity." *Cellular microbiology* 6(2): 143–154.
- Wissowzky, A. (1876). "Ueber das Eosin als Reagenz auf Hämoglobin und die Bildung von Blutgefäßen und Blutkörperchen bei Säugetier und Hühnerembryonen." *Archiv für mikroskopische Anatomie* 1876; 13:479-496.
- Wroblewski, L. E., et al. (2009). "*Helicobacter pylori* dysregulation of gastric epithelial tight junctions by urease-mediated myosin II activation." *Gastroenterology* 136(1): 236–246.
- Wuppenhorst, N., et al. (2014). "Prospective multicentre study on antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Germany." *J Antimicrob Chemother*, 69(11), 3127-3133.
- Xiang, Z., et al. (1995). "Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin." *Infection and immunity* 63(1): 94–98.
- Yahiro, K., et al. (1999). "Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta." *The Journal of biological chemistry* 274(51): 36693–36699.
- Yahiro, K., et al. (2003). "Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor." *The Journal of biological chemistry* 278(21): 19183–19189.
- Yamaoka, Y., et al. (2002). "Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production." *Gastroenterology* 123(2): 414–424.
- Yamaoka, Y., et al. (2004). "Role of interferon-stimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in *Helicobacter pylori* infection." *Gastroenterology* 126(4): 1030–1043.
- Yamaoka, Y., et al. (2006). "*Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease." *Gut* 55(6): 775–781.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." *Gene*, 33(1), 103-119.
- Yokota, S., et al. (2007). "Highly-purified *Helicobacter pylori* LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not Toll-like receptor 4 complex." *FEMS Immunol Med Microbiol* 51(1): 140-148.
- Yoshiyama, H., et al. (1999). "Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment." *Journal of gastroenterology* 34 Suppl 11: 18–23.
- Zuk, A. and K. S. Matlin (1996). "Apical beta 1 integrin in polarized MDCK cells mediates tubulocyst formation in response to type I collagen overlay." *J Cell Sci* 109 ( Pt 7): 1875-1889.
- Zupan, J., et al. (2000). "The transfer of DNA from *agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights." *Plant J* 23(1): 11-28.

## VI Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
A	Ampere
AGS	engl.: „gastric adenocarcinoma“
AMP	Adenosinmonophosphat
AmpR	Ampicillinresistenz
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BB	engl.: „brucella broth“; Brucella Medium
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	engl.: „cluster of differentiation“
CagA	Cytotoxin-assoziiertes Antigen A
<i>cag</i> PAI	<i>cag</i> -Pathogenitätsinsel
CamR	Chloramphenicolresistenz
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
CEACAM	engl.: „carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules“
CFU	engl.: „colony-forming units“
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
c-src	Akronym aus aus <u>c</u> ellular und <u>s</u> arcoma (-Tyrosinkinase)

C- Terminus	Carboxyterminaler Bereich der DNA bzw. eines Proteins
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid (DNS; Desoxyribonukleinsäure)
DNaseI	Desoxyribonuklease I
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl.: „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“; Enzymimmunoassay
ErmR	Erythromycinresistenz
<i>et al.</i>	lat.: „et alii“; und andere
FACS	Fluorescent activated cell sorter, Durchflusszytometer
FCS	engl.: „fetal calf serum“; Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiacyanate
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
g	Gramm
(x) g	x- faches der Erdbeschleunigung
GFP	engl.: „green fluorescent protein“
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	engl.: „granulocyte macrophage colony-stimulating factor“
Grb2	engl.: „Growth factor receptor-bound (protein) 2“
GSK	Glykogensynthase-Kinase
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	einfach destilliertes Wasser
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter

LB- Medium	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (mol/l)
m	milli ( $10^{-3}$ )
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	engl.: „multiplicity of infection“
MUC	engl.: „mucin“; Muzin
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
n	nano ( $10^{-9}$ ) oder als Anzahl (von Experimenten)
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OMP	engl.: „outer membrane protein“
orf	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	lat.: „potentia Hydrogenii“
POX	Meerrettichperoxidase
PPI	Protonenpumpeninhibitor
P-Tyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidinfluoride
rpm	engl.: „rounds per minute“; Umdrehungen pro Minute
RPMI-Medium	engl.: „Roswell Park Memorial Institute“-Medium
RT	Raumtemperatur

sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC-Medium	engl.: „Super Optimal Broth“-Medium
STAT	engl.: „Signal transducer and activator of transcription“
StrR	Streptomycinresistenz
T4SS	<i>Helicobacter pylori</i> Typ-IV-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	<u>TRIS</u> - <u>Acetat</u> - <u>EDTA</u> -Puffer
Taq	hitzestabile DNA Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	engl.: „Tris-buffered saline“
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris- HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜN	Über Nacht
V	Volt
(v/v)	Volumen pro Volumen
<i>vacA</i>	Gen von VacA
VacA	eng.: „Vacuolating cytotoxin“ A
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewicht pro Volumen

## VIII Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Wolfgang Fischer für die hervorragende Unterstützung in allen Belangen, die eine solche Arbeit mit sich bringt. Als Naturwissenschaftler wies er mich, die angehende Ärztin, geduldig in die vielen Methoden der Laborarbeit ein. Darüberhinaus war es seine immerwährende Diskussionsbereitschaft, welche mir eine kritische Sicht auf die Themen dieser Arbeit ermöglichte und mich motivierte. Gleichmaßen möchte ich Prof. Dr. Rainer Haas für seine fachliche Expertise und das kollegiale Arbeitsklima im Labor danken.

Für die finanzielle Unterstützung während meiner Arbeit danke ich dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München. Die in diesem Rahmen stattgehabten Methodenseminare und Vorträge schufen erste Berührungspunkte mit der wissenschaftlichen Praxis und schürten mein Interesse in diesem Bereich.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den lieben Mitarbeitern der AG Haas, die das tägliche Arbeiten im Labor so angenehm gemacht haben. Hier seien besonders Friedericke mit ihrem außergewöhnlichen Optimismus und ihrer ehrlichen inspirierenden Art, Evelyn, deren Humor ansteckend ist und die immer ein offenes Ohr hatte sowie Luisa, die eine bewundernswert akkurate Arbeitsweise an den Tag legte, genannt.

Meinen zutiefst empfundenen Dank möchte ich meinen Eltern und meinem Ehemann aussprechen, denn sie sind es, die mich mit viel Liebe und Verständnis auf meinem Weg begleiten und unterstützen. Ich bin unendlich froh, dass ich euch habe! Gleichmaßen danke ich meiner Familie in der Nähe und der Ferne sowie meinen Freunden, die immer für mich da waren. Zuletzt danke ich meinem vielvermissten Opa, der immer an mich glaubte.



## Eidesstattliche Versicherung

Woischke, Christine

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss des Cag-Typ-IV-Sekretionssystems von *Helicobacter pylori* auf die Migration von Phagozyten

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 01.08.2016

Christine Woischke

---

Ort, Datum

---

Name Doktorandin